

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LILIANE DE PAULA SILVA

**PROSPECÇÃO PROTEÔMICA DE BIOMARCADORES PLASMÁTICOS
ASSOCIADOS AO DIABETES *MELLITUS* TIPO 1 E TIPO 2**

CURITIBA

2018

LILIANE DE PAULA SILVA

**PROSPECÇÃO PROTEÔMICA DE BIOMARCADORES PLASMÁTICOS
ASSOCIADOS AO DIABETES *MELLITUS* TIPO 1 E TIPO 2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Dayane Alberton
Coorientador: Prof. Dr. Geraldo Picheth

CURITIBA

2018

Silva, Liliâne de Paula

Prospecção proteômica de biomarcadores plasmáticos associados ao Diabetes mellitus tipo 1 e tipo 2 / Liliâne de Paula Silva – Curitiba, 2018.

96 f. : il.(algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Dayane Alberton

Coorientador: Professor Dr. Geraldo Picheth

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Diabetes mellitus. 2. Alfa 2-macroglobulinas lentas. 3. Ceruloplasmina. 4. Haptoglobina.
5. Apolipoproteína A-I. I. Alberton, Dayane. II. Picheth, Geraldo. III. Universidade Federal do Paraná.
IV. Título.

CDD 616.46

Maria da Conceição Kury da Silva – CRB – 9/1275



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **LILIANE DE PAULA SILVA** intitulada: **PROSPECÇÃO PROTEÔMICA DE BIOMARCADORES PLASMÁTICOS ASSOCIADOS AO DIABETES MELLITUS TIPO 1 E TIPO 2**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 02 de Março de 2018.

DAYANE ALBERTON
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

MAUREN ISFER ANGHEBEM OLIVEIRA
Avaliador Externo (UFPR)

MARCELO MULLER DOS SANTOS
Avaliador Externo (UFPR)

Dedico este trabalho aos meus pais Romilda Aparecida Cavalheiro Silva e Luiz de Paula Silva, ao meu irmão Agnaldo Leonardo Cavalheiro Silva e ao meu marido Breidi Albach por todo o apoio e incentivo em minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre estar ao meu lado me conduzindo pelos melhores caminhos e me ajudando a tomar as melhores escolhas.

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

À professora Dra. Dayane Alberton pela orientação, pelo acolhimento sempre com um sorriso no rosto mesmo em momentos difíceis, por acreditar no meu potencial, permitindo meu crescimento pessoal e profissional em inúmeros aspectos.

Ao professor Dr. Geraldo Picheth por sua co-orientação, ensinamentos, paciência e seus valerosos aconselhamentos.

À professora Dra. Fabiane Gomes de Moraes Rego por toda ajuda prestada durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Dr. Glaucio Valdameri pelos seus ensinamentos e por me mostrar o quão é importante ter senso crítico e principalmente não aceitar tudo como uma “verdade absoluta”.

À mestre Catiane Pompilio Brescansin (*in memoriam*) que sempre estará em nossos corações e mente.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro.

Aos amigos e colegas do Grupo de Pesquisa em Doenças Metabólicas – GPDM por toda ajuda prestada no desenvolvimento deste trabalho.

A todos, o meu **MUITO OBRIGADA**.

RESUMO

O diabetes *mellitus* (DM) é uma doença crônica de incidência mundial caracterizado por um quadro hiperglicêmico resultante da deficiência na síntese da insulina, ação, ou em ambos. O diagnóstico precoce do diabetes, atrelado ao adequado tratamento e monitoramento, permite minimizar e postergar o aparecimento das complicações associadas (nefropatia, retinopatia, doença cardiovascular, entre outras). Desta forma, faz-se necessário a busca de novos biomarcadores para o diagnóstico, prognóstico e monitoramento da doença. Portanto, o objetivo deste trabalho foi a avaliação da expressão diferencial de proteínas plasmáticas por análise proteômica comparativa em pacientes DM1 e DM2 com mau e bom controle glicêmico e indivíduos controle. Para a remoção das proteínas mais abundantes do plasma, duas técnicas de extração foram testadas: kit comercial Proteome Purify™ 2 e acetona 50% (v/v). Após esses tratamentos as proteínas plasmáticas foram separadas por eletroforese 1D SDS-PAGE 10%, analisadas por densitometria e identificadas por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF. Para o tratamento com o kit Proteome Purify™2, 16 bandas proteicas foram visualizadas no gel para ambos os grupos DM1 e DM2, e 4 bandas proteicas identificadas como α -2-macroglobulina (α -2-M), ceruloplasmina (Cp), haptoglobina (Hp) e apolipoproteína A-I (ApoA-I) apresentaram volumes relativos maiores e estatisticamente significativos em relação ao grupo controle. A proteína α -2-M, nos subgrupos DM1 com mau e bom controle glicêmico e no subgrupo DM2 com mau controle glicêmico, apresentou um volume relativo maior e com significância estatística quando comparado ao grupo controle. A expressão da proteína Cp nos subgrupos DM1 e DM2 com mau e bom controle glicêmico foi maior e com significância estatística em relação ao grupo controle e, ao comparar os subgrupos, a expressão da Cp foi superior no subgrupo DM1 com mau controle glicêmico em relação ao subgrupo DM1 com bom controle glicêmico. A proteína plasmática Hp foi identificada em duas bandas proteicas diferentes nos grupos em estudo e a expressão de Hp, considerando ambas as bandas, foi superior nos subgrupos DM1 e DM2 com mau controle glicêmico em relação ao grupo DM1 e DM2 com bom controle glicêmico e ao grupo controle. Já a proteína apoA-I apresentou aumento de expressão com significância estatística apenas nos subgrupos DM1 com mau e bom controle glicêmico em relação ao grupo controle. No tratamento com acetona 50% (v/v), 12 bandas foram visualizadas no gel 1D para os grupos em estudo, mas apenas as bandas referentes à Cp e Hp apresentaram diferença de expressão entre os grupos. A expressão da proteína Cp nos subgrupos DM1 e DM2 com mau e bom controle glicêmico foi maior e com significância estatística em relação ao grupo controle e, ao comparar os subgrupos, a expressão da Cp foi superior no subgrupo DM2 com mau controle glicêmico em relação ao subgrupo DM2 com bom controle glicêmico. A expressão da Hp foi superior nos subgrupos DM1 com mau e bom controle glicêmico e no subgrupo DM2 com mau controle glicêmico em relação ao grupo controle. Portanto, é possível inferir que os pacientes portadores de DM1 e DM2 com mau e bom controle glicêmico apresentam um quadro inflamatório subclínico devido à maior expressão de proteínas de fase aguda positiva de processo inflamatório.

Palavras chave: Diabetes *Mellitus*, α -2-macroglobulina, Ceruloplasmina, Haptoglobina, Apolipoproteína A-I, Estudo Proteômico

ABSTRACT

Diabetes *mellitus* (DM) is a chronic disease of global incidence characterized by a hyperglycemic resulting from deficiency in insulin synthesis, action, or both. The early diagnosis of diabetes, coupled with the adequate treatment and monitoring, allows minimizing and delaying the appearance of associated complications (nephropathy, retinopathy, cardiovascular disease, among others), improving the quality of life of those affected and reducing the costs of the public health system. Thus, it is necessary to search for new biomarkers for the diagnosis, prognosis and monitoring of the disease. Therefore, the objective of this work was the evaluation of the differential expression of plasma proteins by comparative proteomic analysis in DM1 and DM2 patients with poor and good glycemic control and control subjects. For the removal of the most abundant proteins from plasma, two extraction techniques weretested: Proteome Purify™ 2 commercial kit and 50% (v/ v) acetone. After these treatments, the plasma proteins were separated by 10% SDS-PAGE 1D electrophoresis, analyzed by densitometry and identified by MALDI-TOF type mass spectrometry. For the treatment with the Proteome Purify kit, 16 protein bands were visualized on the gel for both DM1 and DM2 groups, and 4 protein bands identified as α -2-macroglobulin (α -2-M), ceruloplasmin (Cp), haptoglobin (Hp) and apolipoprotein AI (ApoA-I) presenting higher and statistically significant relative volumes in relation to the control group. The α -2-M protein in the DM1 subgroups with poor and good glycemic control and in the DM2 subgroup with poor glycemic control had a higher relative volume and with statistical significance when compared to the control group. The expression of Cp protein in the DM1 and DM2 subgroups with poor and good glycemic control was higher and statistically significant in relation to the control group, and when comparing the subgroups, the expression of Cp was superior in the DM1 subgroup with poor glycemic control compared to subgroup DM1 with good glycemic control. The Hp plasma protein was identified in two different protein bands in the study groups and considering both bands, Hp expression was higher in the DM1 and DM2 subgroups with poor glycemic control compared to the DM1 and DM2 groups with good glycemic control and group control. The apoA-I protein presented expression increased and with statistical significance only in DM1 subgroups with poor and good glycemic control in relation to the control group. In the 50% (v/v) acetone treatment, 12 bands were visualized on the 1D gel for study groups and only the protein bands of the Cp and Hp presented higher and statistically significant relative volumes in DM1 and DM2 groups in relation to the control group. The expression of Cp protein in the DM1 and DM2 subgroups with poor and good glycemic control was higher and statistically significant in relation to the control group and, when comparing the subgroups, the expression of Cp was superior in the DM2 subgroup with poor glycemic control in relation to the subgroup with good glycemic control. The expression of Hp was superior in the DM1 subgroups with poor and good glycemic control and in the DM2 subgroup with poor glycemic control compared to the control group. Therefore, it is possible to infer that patients with DM1 and DM2 with poor and good glycemic control present a subclinical inflammatory due to the greater expression of positive acute phase proteins of inflammatory process.

Keywords: Diabetes *Mellitus*, α -2-macroglobulin, Ceruloplasmin, Haptoglobin, Apolipoprotein A-I, Proteomic Study

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. MECANISMO IMUNE ENVOLVIDO NA DESTRUIÇÃO DAS CÉLULAS BETA.....	13
FIGURA 2. APRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO DESENVOLVIMENTO DO DIABETES <i>MELLITUS</i> TIPO 2	16
FIGURA 3. VALORES DE HEMOGLOBINA GLICADA NOS DIFERENTES GRUPOS EM ESTUDO	39
FIGURA 4. PERFIL ELETROFORÉTICO DO <i>POOL</i> PROTEÍNAS PLASMÁTICAS DO GRUPO DM1 TRATADAS COM KIT DE IMUNODEPLEÇÃO E ACETONA 50% (v/v).....	41
FIGURA 5. PERFIL ELETROFORÉTICO DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS DO GRUPO DM2 TRATADAS COM KIT DE IMUNODEPLEÇÃO (A) E ACETONA 50% (v/v).....	42
FIGURA 6. ESPECTROS DE MASSA/CARGA (M/Z) REPRESENTATIVOS PARA ALGUMAS BANDAS DE PROTEÍNAS COM POTENCIAL EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS GRUPOS DM1 E DM2 EM RELAÇÃO AO CONTROLE.	44
FIGURA 7. ANÁLISE DENSITOMÉTRICA COMPARATIVA DA PROTEÍNA ALFA-2-MACROGLOBULINA NOS GRUPO DM1, DM2 E CONTROLE TRATADOS COM KIT DE IMUNODEPLEÇÃO PROTEOME PURIFY 2.	46
FIGURA 8. ANÁLISE DENSITOMÉTRICA COMPARATIVA DA CERULOPLASMINA NOS GRUPO DM1, DM2 E CONTROLE TRATADOS COM KIT DE IMUNODEPLEÇÃO PROTEOME PURIFY 2.....	47
FIGURA 9. ANÁLISE DENSITOMÉTRICA COMPARATIVA DA HAPTOGLOBINA CORRESPONDENTE A BANDA N NOS GRUPO DM1, DM2 E CONTROLE TRATADOS COM KIT DE IMUNODEPLEÇÃO PROTEOME PURIFY 2	48
FIGURA 10. ANÁLISE DENSITOMÉTRICA COMPARATIVA DA HAPTOGLOBINA CORRESPONDENTE A BANDA P NOS GRUPO DM1, DM2 E CONTROLE TRATADOS COM KIT DE IMUNODEPLEÇÃO PROTEOME PURIFY 2	49
FIGURA 11. ANÁLISE DENSITOMÉTRICA COMPARATIVA DA APOLIPOPROTEÍNA A-I NOS GRUPO DM1, DM2 E CONTROLE TRATADOS COM KIT DE IMUNODEPLEÇÃO PROTEOME PURIFY 2.....	50
FIGURA 12. ANÁLISE DENSITOMÉTRICA COMPARATIVA DA PROTEÍNA ALFA-2-MACROGLOBULINA NOS GRUPOS DM1, DM2 E CONTROLE TRATADOS ACETONA 50% (V/V).....	51
FIGURA 13. ANÁLISE DENSITOMÉTRICA COMPARATIVA DA PROTEÍNA CERULOPLASMINA NOS GRUPO DM1, DM2 E CONTROLE TRATADOS COM ACETONA 50% (v/v).....	51
FIGURA 14. ANÁLISE DENSITOMÉTRICA COMPARATIVA PROTEÍNA HAPTOGLOBINA NOS GRUPO DM1, DM2 E CONTROLE TRATADOS ACETONA 50% (v/v).....	52

FIGURA 15. ESTRUTURA DA PROTEINA HP EM INDIVÍDUOS COM DIFERENTES GENÓTIPOS	61
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. CLASSIFICAÇÃO ETIOLÓGICA DO DM	11
TABELA 2. VALORES DE GLICOSE PLASMÁTICA PARA DIAGNÓSTICO DE DIABETES MELLITUS	21
TABELA 3. FUNÇÕES DAS DIFERENTES PROTEÍNAS PLASMÁTICAS.....	27
TABELA 4. PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS EM DIABÉTICOS ...	32
TABELA 5. AMOSTRAS DE PLASMA AGRUPADAS DE ACORDO COM OS NÍVEIS DE HEMOGLOBINA GLICADA	33
TABELA 6. DADOS ANTROPOMÉTRICOS E BIOQUÍMICOS DOS GRUPOS DM1, DM2 E CONTROLE.....	38
TABELA 7. IDENTIFICAÇÃO DAS BANDAS PROTEICAS DOS GRUPO DM1 E DM2 COM MAU E BOM CONTROLE GLICÊMICO E GRUPO CONTROLE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DO TIPO MALDI-TOF	43
TABELA 8. IDENTIFICAÇÃO DAS BANDAS PROTEICAS TRATADAS COM ACETONA 50% (v/v) DO GRUPO DM1 COM MAU E BOM CONTROLE GLICÊMICO E GRUPO CONTROLE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DO TIPO MALDI-TOF	45

LISTA DE SIGLAS

1,5-AG	1,5-Anidroglucitol
4HCCA	Ácido ciano-4-hidroxicinamínico
A1c ou HbA1c	Hemoglobina glicada A1c
ABCA1	Transportador de cassete de ligação de ATP ABCA1 ou também conhecido como proteína reguladora de efluxo de colesterol (CERP)
ACN	Acetonitrila
AG	Albumina glicada
AGCC	Ácido Graxo de cadeia curta
AGEs	Produtos finais de glicação avançadas
Anti-GAD	Antidescarboxilase do ácido glutâmico
AP-1	Proteína ativadora-1
ApoA-I	Apolipoproteína A-I
AVC	Acidente vascular cerebral
CBB	Comassie Brilliant Blue G-250
CP	Ceruloplasmina
DAP	Doença arterial periférica
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
CDs	Células dendríticas
DM	Diabetes <i>Mellitus</i>
DM1	Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 1
DM2	Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 2
DM tipo 1A	Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 1A
DM tipo 1B	Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 1 B
DMG	Diabetes <i>Mellitus</i> gestacional
DRD	Doença renal crônica do diabetes ou Nefropatia diabética

EDTA	Anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Fas	Proteína Faz ou CD95
FasL	Ligante da proteína Fas
GLUT	Transportadores de glicose
GLUT-4	Transportador de glicose 4
GlyHb	Hemoglobina livre glicada
GlyHb-Hp	Complexo Haptoglobina-hemoglobina glicada
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IA2	Anticorpo anti-tirosina fosfatase
IAA	Anticorpo anti-insulina
ICA155	Anticorpo anti-ilhota pancreática
ICA	Células das ilhotas pancreáticas
IFN-γ	Interferon- γ
IgG	Imunoglobulina G
IκB-cinase	Enzima inibidora do fator de transcrição Kappa beta
IL-1β-	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina 6
IL-12	Interleucina 12
IMC-	Índice de massa corporal
IRC	Insuficiência renal crônica
IRS-1	Substrato do receptor de insulina
ITU	Infeções do trato urinário
JNK	Proteína cinase JNK
kDa	kilodaltons ou kDa
MS	Espectrometria de massas

ND	Neuropatia diabética
NF-kB	Fator de transcrição kappa beta
PFAs	Proteínas de fase aguda positiva
NK	Células natural <i>Killer</i>
RD	Retinopatia diabética
RI	Resistência à insulina
TFA	Ácido trifluoroacético
TLR4	Receptor Toll-4
TNFα	Fator de necrose tumoral α
UC-UFPR	Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 OBJETIVOS	9
2.1. OBJETIVO GERAL	9
2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO	9
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
3.1. DIABETES	10
3.2. CLASSIFICAÇÃO DO DIABETES <i>MELLITUS</i>	11
3.2.1 Diabetes <i>Mellitus</i> Tipo 1	11
3.2.2 Diabetes <i>Mellitus</i> Tipo 2	14
3.3. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DO DIABETES <i>MELLITUS</i>	19
3.4 CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO E CONTROLE GLICÊMICO DO DIABETES <i>MELLITUS</i>	20
3.4.1. Outros métodos de diagnóstico e avaliação do controle glicêmico	22
3.4.2.1 Dosagem 1,5 anidroglicitol (1,5 AG)	22
3.4.2.2 Frutosamina e Albumina Glicada (AG)	23
3.5. COMPLICAÇÕES DO DIABETES <i>MELLITUS</i>	24
3. 6 PROTEÍNAS PLASMÁTICAS	26
3.7 ANÁLISE PROTÊOMICA	28
3.7.1 Biomarcadores proteicos relacionados ao Diabetes <i>Mellitus</i>	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1. COMITÊ DE ÉTICA	33
4.2. OBTENÇÃO DA AMOSTRAS ANALISADAS	33
4.3. EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS	34
4.4. DOSAGEM DAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS	34
4.5.ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL DESNATURANTE (SDS-PAGE)	35
4.6. CAPTURA DAS IMAGENS DOS GÉIS DE POLIACRILAMIDA E ANÁLISE DENSITOMÉTRICA	35
4.7. CLIVAGEM DAS PROTEÍNAS POR TRIPSINIZAÇÃO DAS BANDAS PROTEICAS E ESPECTROMETRIA DE MASSA	35
4.8.OBTENÇÃO E ANÁLISE DOS ESPECTROS DE MASSAS	36
4.9. IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS	36
4.10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	37

5. RESULTADOS.....	38
5.1 CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS E BIOQUÍMICAS DOS GRUPOS ESTUDADOS.....	38
5.2 ANÁLISE COMPARATIVA DAS METODOLOGIAS EMPREGADAS PARA REMOÇÃO A REMOÇÃO DAS PROTEÍNAS MAIS ABUNDANTES DO PLASMA: KIT PROTEOME PURIFY 2 E ACETONA 50% (V/V).....	39
5.3. IDENTIFICAÇÃO DAS BANDAS PROTEICAS DO GRUPO DM1, DM2 E CONTROLE TRATADOS COM KIT PROTEOME PURIFY™ 2 POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DO TIPO MALDI-TOF	42
5.4. IDENTIFICAÇÃO DAS BANDAS PROTEICAS DO GRUPO DM1, DM2 E CONTROLE TRATADOS COM ACETONA 50% (v/v) POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DO TIPO MALDI-TOF	44
5.5 ANÁLISE DENSITOMÉTRICA COMPARATIVA DAS BANDAS PROTEICAS DOS GRUPOS DM1, DM2 E CONTROLE TRATADOS COM KIT PROTEOME PURIFY™ 2	46
5.5.1 Análise comparativa densitométrica da proteína α -2-macroglobulina dos grupos DM1 e DM2 com hemoglobina glicada $\geq 7\%$, $< 7\%$ e grupo controle tratados com kit Proteome Purify™ 2	46
5.5.2 Análise comparativa densitométrica da proteína ceruloplasmina dos grupos DM1 e DM2 com hemoglobina glicada $\geq 7\%$, $< 7\%$ e grupo controle tratados com kit Proteome Purify™ 2	47
5.5.3 Análise comparativa densitométrica da proteína Haptoglobina dos grupos DM1 e DM2 com hemoglobina glicada $\geq 7\%$, $< 7\%$ e grupo controle tratados com kit Proteome Purify™ 2	48
5.5.4 Análise comparativa densitométrica da proteína apolipoproteína A-I dos grupos DM1 e DM2 com hemoglobina glicada $\geq 7\%$, $< 7\%$ e grupo controle tratados com kit Proteome Purify™ 2	49
5.6. ANÁLISE DENSITOMÉTRICA COMPARATIVA DAS BANDAS PROTEICAS DOS GRUPOS DM1 E DM2 COM HEMOGLOBINA GLICADA $\geq 7\%$, $< 7\%$ E GRUPO CONTROLE TRATADAS COM ACETONA 50% (V/V)	50
5.6.1 Análise comparativa densitométrica da proteína α -2-macroglobulina dos grupos DM1 e DM2 com hemoglobina glicada $\geq 7\%$, $< 7\%$ e grupo controle com solvente acetona 50% (v/v)	50
5.6.2 Análise comparativa densitométrica da proteína ceruloplasmina dos grupos DM1 e DM2 com hemoglobina glicada $\geq 7\%$, $< 7\%$ e grupo controle com solvente acetona 50% (v/v)	51
5.6.3 Análise densitométrica comparativa da proteína Haptoglobina dos grupos DM1 e DM2 com hemoglobina glicada $\geq 7\%$, $< 7\%$ e grupo controle/não-diabéticos com solvente acetona 50% (v/v)	52

6. DISCUSSÃO	53
6.1 CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS E BIOQUÍMICAS DOS GRUPOS ESTUDADOS.....	53
6.2 ANÁLISE COMPARATIVA DE EFICÁCIA ENTRE KIT PROTEOME PURIFY™ 2 E ACETONA 50% (v/v)	54
6.3 ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA DOS <i>POOLS</i> DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS DOS GRUPOS DM1 E DM2 COM BOM E MAU CONTROLE GLICÊMICO E GRUPO CONTROLE.....	56
7. CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS	66
APÊNICE 1	85

1 INTRODUÇÃO

O diabetes *mellitus* (DM) destaca-se como uma das principais doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) de caráter epidêmico, acometendo aproximadamente 387 milhões de pessoas no mundo, e deverá afetar 592 milhões de pessoas em 2035 (SBD, 2015; WAN et al., 2015). De acordo com a Federação Internacional do Diabetes, o Brasil possui 11,9 milhões de indivíduos entre 20 e 79 anos com diabetes *mellitus* (IDF, 2015).

O DM é um conjunto heterogêneo de distúrbios metabólicos crônicos, caracterizado por hiperglicemia, resultante de defeitos na ação da insulina, secreção ou em ambas (ADA, 2017). Com base na etiologia, o diabetes *mellitus* é classificado em 4 grupos principais, diabetes *mellitus* tipo 1, diabetes *mellitus* tipo 2, diabetes *mellitus* gestacional e outros tipos de diabetes (ADA, 2017).

O diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) é considerado uma doença autoimune que promove a autodestruição das células beta pancreáticas e conseqüentemente leva a deficiência total da insulina (ADA, 2017). No entanto, existem casos em que o processo autoimune não é evidenciado, caracterizando uma forma idiopática de DM1 (SBD, 2016). Os pacientes com DM1 são, de maneira geral, jovens (crianças ou adolescentes), mas a doença pode manifestar-se em indivíduos adultos (SESTERHEIM; SAITOVITCH; STAUB, 2007).

Já o diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), uma doença endócrina, multifatorial, caracterizada por uma hiperglicemia decorrente de uma deficiência na ação e/ou secreção da insulina relativa (ARSA et al., 2009). O DM2 corresponde entre 90% e 95% dos casos de DM diagnosticados (SBD, 2015) e acomete indivíduos de todas as faixas etárias, com maior predominância em adultos com sobrepeso ou obesidade (VASQUES et al., 2007). Em decorrência da hiperglicemia crônica, várias são as complicações que surgem a curto e longo prazo no paciente diabético como por exemplo, cetoacidose (mais comum em pacientes DM1), cardiomiopatia, nefropatia e retinopatia (RANG et al., 2011).

Os critérios de diagnóstico para o diabetes *mellitus* são baseados em parâmetros bioquímicos estabelecidos e recomendados pelas Sociedade Americana de Diabetes (2017) e Diretrizes da Sociedade Brasileira do Diabetes (2016) tais como: glicemia de jejum, teste oral de tolerância a glicose e dosagem de hemoglobina glicada. Em alguns casos e condições específicas existem outros critérios de

avaliação glicêmica como a albumina glicada, frutossamina e o 1,5 anidroglicitol, mas ainda não disponíveis na prática clínica (SBD, 2016).

Apesar dos avanços nas formas de diagnóstico do DM nas últimas décadas, a busca de biomarcadores para a detecção precoce e monitoramento da doença ainda é um desafio que impulsiona constantemente a pesquisa científica sobre o tema. Desta forma, o estudo proteômico tornou-se uma ferramenta importante na detecção de potenciais biomarcadores para o DM (SHAO; GUO; AEBERSOLD, 2015). O estudo proteômico é um ramo da ciência que estuda um conjunto de proteínas ou suas isoformas, expressão diferencial de proteínas, modificações e interações proteicas. As fontes para o estudo proteômico podem ser as mais variadas possíveis, como microrganismos, tecidos e fluidos biológicos (plasma, urina, lágrima etc) (SCHVARTZ et al., 2015; SLEDDER et al., 2014).

Portanto, pesquisas que promovam e amplifiquem o conhecimento fisiopatológico do diabetes *mellitus* tipo 1 e tipo 2 e busquem por novos biomarcadores para o diagnóstico, prognóstico e monitoramento são de extrema importância para essa patologia, por ser de caráter crônico, progressivo, de incidência mundial e alta morbimortalidade dos indivíduos (GOPALAKRISHNAN; PURUSHOTHAMAN; BHASKAR, 2015). Neste contexto, os estudos na área proteômica são de grande relevância sendo esta uma ferramenta analítica substancialmente útil para a pesquisa de potenciais biomarcadores, para o diagnóstico e monitoramento do DM (MARTIN et al., 2015). Diante do exposto, neste estudo identificou-se, por análise proteômica comparativa, novos potenciais biomarcadores proteicos associados ao diagnóstico e monitoramento do diabetes *mellitus* tipo 1 e tipo 2.

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar por análise proteômica comparativa, a expressão diferencial das proteínas plasmáticas de pacientes com diabetes tipo 1 e 2 e indivíduos não-diabéticos.

2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

- Selecionar pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 e tipo 2, bem como grupo de indivíduos não diabéticos pareados por idade e tempo de doença pós diagnóstico;
- Extrair as proteínas mais abundantes (albumina e imunoglobulinas) do plasma e selecionar o melhor método de extração, kit Proteome Purify™ 2 (Sigma-Aldrich, EUA) e acetona 50% (v/v);
- Separar as proteínas por eletroforese unidimensional (SDS-PAGE);
- Detectar diferenças de expressão das bandas proteicas entre os grupos estudados por densitometria;
- Identificar as proteínas diferencialmente expressas nos referidos grupos por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. DIABETES

O termo diabetes é derivado da escrita grega *diabaínō* (*diá* – através, *báinō* – passar) e *mellito* deriva da palavra em latim *mellitus* (de mel, adoçado com mel) em alusão a característica adocicada da urina dos indivíduos diabéticos. Portanto, diabetes *mellitus* se refere à poliúria e a hiperglicemia sofrida pelos pacientes (BOGLIOLO, et al, 2012).

Os primeiros relatos sobre o diabetes foram feitos pelos egípcios a 1500 a.C, nos quais haviam descrições dos aspectos clínicos mais evidentes, como o aumento do volume de urina e perda de peso. O médico romano Areteus, que viveu entre 80 e 138 d.C, introduziu o termo diabetes *mellitus* (DM) a doença, mas somente em 1776, o inglês Mathew Dobson descobriu um aumento na excreção e concentração de glicose na urina de pacientes diabéticos (POLONSKY, 2012).

Em 1812, o DM foi reconhecido como uma patologia clínica. Na época, a prevalência do DM não foi documentada, e também não se tinha conhecimento dos mecanismos responsáveis pela doença bem como nenhum tratamento adequado, sendo o DM considerado uma doença fatal (POLONSKY, 2012).

No ano de 1869, o pesquisador Paul Langerhans descobriu e descreveu no tecido pancreático um grupo de células especializadas, que foram denominadas as ilhotas de Langerhans até os dias atuais. No entanto a descoberta e o isolamento da insulina ocorreu somente em meados de 1921 pelos pesquisadores Bating e Best. A descoberta da insulina resultou em um marco na história e no tratamento da doença (SILVA, 2006). Nas décadas de 70 e 80, inúmeros avanços foram alcançados na área da diabetologia, como a síntese e purificação da insulina humana, bomba de administração de insulina subcutânea e “canetas” cartuchos de insulina prontas para o uso pelo paciente (SILVA, 2006).

Apesar dos avanços, o número de casos de diabetes está crescendo de forma exponencial em virtude do aumento da longevidade dos indivíduos, da urbanização, obesidade e do sedentarismo (SBD, 2015). A urbanização das grandes cidades tem como consequências as mudanças drásticas no estilo de vida das pessoas, que vêm

acompanhadas de fatores de risco para doenças não transmissíveis como o DM (ADA, 2015).

3.2. CLASSIFICAÇÃO DO DIABETES *MELLITUS*

O diabetes *mellitus* é classificado com base na sua etiologia em 4 grupos principais (TABELA 1) (ADA, 2017; MARASCHIN et al., 2010).

TABELA 1. CLASSIFICAÇÃO ETIOLÓGICA DO DM

1. Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
Imunomediado
Idiopático
2. Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
3. Diabetes <i>mellitus</i> gestacional
4. Outros tipos específicos de Diabetes <i>mellitus</i>
Defeitos genéticos da célula β (MODY, DNA mitocondrial)
Diabetes lipoatrófico (Defeitos genéticos na ação da insulina)
Doenças do pâncreas exócrino (pancreatite)
Endocrinopatias (acromegalia, síndrome de Cushing)
Induzido por drogas (glicocorticoides, tiazídicos)
Infecções (citomegalovírus, rubéola congênita)
Formas imunes incomuns (anticorpos contra receptor da insulina)
Outras síndromes genéticas (síndrome de Down, Turner, Prader Willi)

Adaptado ADA, 2015.

3.2.1 Diabetes *Mellitus* Tipo 1

O diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1), também conhecido por muito tempo como diabetes juvenil, devido à elevada incidência antes da fase adulta, é uma doença autoimune órgão-específica que acarreta falência pancreática através da destruição por autoanticorpos das células β , ocasionando a deficiência absoluta de insulina e consequente hiperglicemia crônica (BELLE; COPPIETERS; VON HERRATH, 2011).

O DM1 pode ser subdividido em tipo A (representando até 90% de casos totais de DM), com sorologia positiva para autoanticorpos e tipo B (ou idiopática), onde, aparentemente, não se tem mecanismos humorais autoimunes envolvidos no surgimento da doença (EISENBARTH, 2007).

De acordo com Wallberg e colaboradores (2013) o mecanismo imunopatogênico para o desenvolvimento do DM1 é baseado primeiramente em uma resposta imunomediada contra as células β , seguido de características pró-inflamatórias severas (insulite) com aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias e finalizando com uma ineficácia do mecanismo autoregulador das respostas autoimunes promovendo, consecutivamente, a autodestruição, injúria tecidual e cronicidade da doença (WALLBERG; COOKE, 2013).

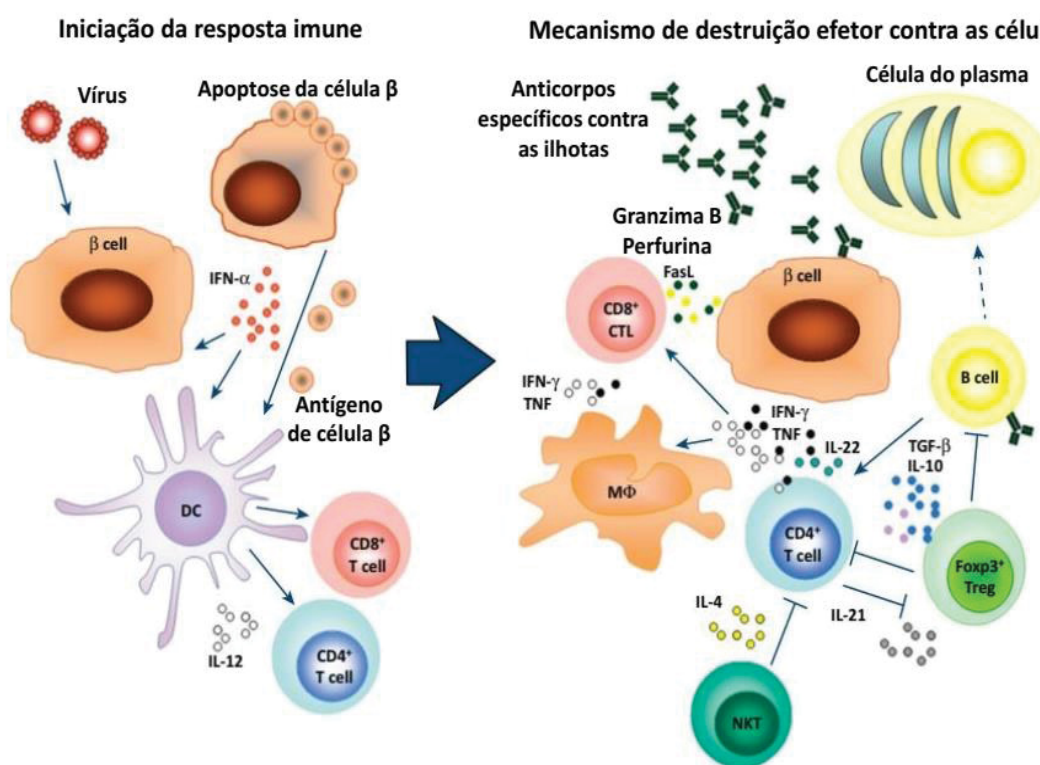
De acordo com Sloboda e colaboradores (2013), os eventos iniciadores da patogênese do DM1 estão relacionados ao reconhecimento de antígenos das células β pelas células dendríticas e macrófagos com posterior apresentação aos linfócitos T CD4+ através do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) e posterior desenvolvimento da resposta imune, mas o mecanismo imune exato ainda não está totalmente elucidado. Embora já existam evidências que a destruição tecidual das células β pancreáticas é decorrente de uma infiltração de células dendríticas, macrófagos, leucócitos e linfócitos T (SLOBODA; BREZER; MALLONE, 2013; STANKOV; BENC; DRASKOVIC, 2013).

Segundo Belle e colaboradores (2011) uma das hipóteses amplamente aceitas para o desenvolvimento do DM1 é que indivíduos geneticamente suscetíveis associados a gatilhos ambientais predisponente ao desenvolvimento da doença iniciam reações autoimune resultando na morte progressiva das células β pancreáticas até uma decadência total na massa destas células que resultam, consequentemente, em hiperglicemia crônica (BELLE; COPPIETERS; VON HERRATH, 2011).

A infiltração de leucócitos no tecido pancreático decorrente de uma infecção viral, por exemplo, resulta em produção de citocinas pró-inflamatórias (fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon-gama (IFN- γ) que desempenham um papel crucial no desenvolvimento fisiopatológico inflamatório do DM1. O aumento de uma série de citocinas inflamatórias como interferon- α que é uma glicoproteína sinalizadora, irá sinalizar para o MHC de classe I (complexo principal de histocompatibilidade de classe I) que por sua vez vai ativar os linfócitos TCD8

citotóxicos que fazem a liberação de grânulos contendo perforinas e granzimas B, bem como através da interação Fas-FasL ligante de Fas (FasL) que são proteínas que promovem a destruição das células β liberando autoantígenos adicinais (BELLE; COPPIETERS; VON HERRATH, 2011). As células dendríticas (CDs) aumentam a expressão de interleucina 12 (IL₁₂) que tem por função aumentar a secreção de interferon- γ em células CD4⁺ e células natural *killer* (NK) exacerbando a resposta imune, as CDs também apresentam antígenos de células β aos linfócitos CD4⁺ que por sua vez apresentam aos linfócitos B que produz anticorpos contra antígenos aumentam ainda mais a resposta imune contra as células β e neste momento já é possível detectar no soro do pacientes anticorpos contra a insulina, normalmente o primeiro que aparece (FIGURA 1) (STANKOV; BENC; DRASKOVIC, 2013; WALLBERG; COOKE, 2013).

FIGURA 1. MECANISMO IMUNE ENVOLVIDO NA DESTRUIÇÃO DAS CÉLULAS BETA.



Adaptado de WALLBERG; COOKE, 2013.

O mecanismo imunológico relacionado a destruição das células β é extremamente complexo e não totalmente conhecido, mas podem ter outras células regulatórias envolvidas no processo, como as células NK que são produtoras de IL-4

(relacionada a diferenciação de linfócitos B), as citocinas IL₁₀, IL₂₂, IL₂₁, as células T (Treg) e forkhead box (Fox)p3⁺ (FIGURA 1) (STANKOV; BENC; DRASKOVIC, 2013; WALLBERG; COOKE, 2013).

Por ser uma patologia autoimune, os autoanticorpos atacam especificamente as células das ilhotas pancreáticas (ICA), a insulina (IAA) e a enzima descarboxilase do ácido glutâmico (GAD) (HAWA et al., 2013). Assim, no soro do paciente, é possível detectar os anticorpos anti-insulina (IAA), anti-ilhota pancreática (ICA512), antidescarboxilase do ácido glutâmico (anti-GAD), anti-tirosina fosfatase (IA2) e anti-transportador do Zinco (WALLBERG; COOKE, 2013). Parentesco de primeiro grau com pacientes DM1 e sorologia positiva para dois ou mais autoanticorpos, são considerados fatores preditivos para o desenvolvimento de hiperglicemia e DM1 (ADA, 2017). No entanto, a taxa de progressão é dependente da idade da primeira detecção de autoanticorpos, número de anticorpos, bem como especificidade e título. Os autoanticorpos são detectáveis no sangue dos pacientes com diagnóstico de DM1 em qualquer faixa etária sendo comumente quantificáveis no período da infância e adolescência, mas a identificação desses anticorpos também pode estender-se à faixa etária adulta. Cabe ressaltar que, a presença de autoanticorpos detectáveis não é suficiente para o desenvolvimento clínico da doença, pois alguns indivíduos com sorologia positiva nunca chegam a desenvolver DM1 (DOMINGUETI et al., 2016; HAWA et al., 2013; ZACCARDI et al., 2016).

3.2.2 Diabetes *Mellitus* Tipo 2

O diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), também conhecido no passado como diabetes *mellitus* não insulino-dependente, é a forma mais frequente de DM, tendo uma prevalência entre 90% a 95% dos casos de DM (ADA, 2018). Os indivíduos acometidos pelo DM2 são geralmente adultos acima de 40 anos, com sobrepeso ou obesidade (RANG et al., 2011).

O DM2 é uma doença complexa, de etiologia não totalmente compreendida (TESTA et al., 2015), mas caracterizada por defeito relativo na secreção da insulina e resistência à ação deste hormônio polipeptídico com consequente hiperglicemia (IMAMURA et al., 2013; SBD, 2015). A resistência à insulina é o passo inicial para o desenvolvimento do DM2, a condição de resistência é decorrente de fatores genéticos associados a fatores adquiridos (particularmente a obesidade) e ambientais

(HUPFELD; OLEFSKY, 2016), sendo considerada, portanto uma patologia multifatorial (AIRES et al., 2008).

Dentre os fatores genéticos responsáveis pela manifestação do DM2, estão os genes responsáveis por mecanismos metabólicos predisponentes, por isso, o DM2 tem caráter poligênico, além de estar relacionado também com histórico familiar e o diabetes gestacional (AIRES et al., 2008). Os indivíduos que possuem parentesco de primeiro grau com pacientes diabéticos, são candidatos para apresentar desenvolvimento de alterações metabólicas e DM2, sendo que estes devem ser monitorados ao longo da vida (HARBI et al., 2016; ROCHA et al., 2007). Em um estudo realizado na população japonesa, foi identificada uma forte associação positiva entre os pais com DM2 e a incidência da doença nos seus descendentes (WANG et al., 2015). Os indivíduos com histórico materno de DM2 apresentaram uma maior probabilidade ($r=2,35$) para o desenvolvimento da doença em relação a indivíduos com histórico paterno apenas ($r=1,98$) (WANG et al., 2015).

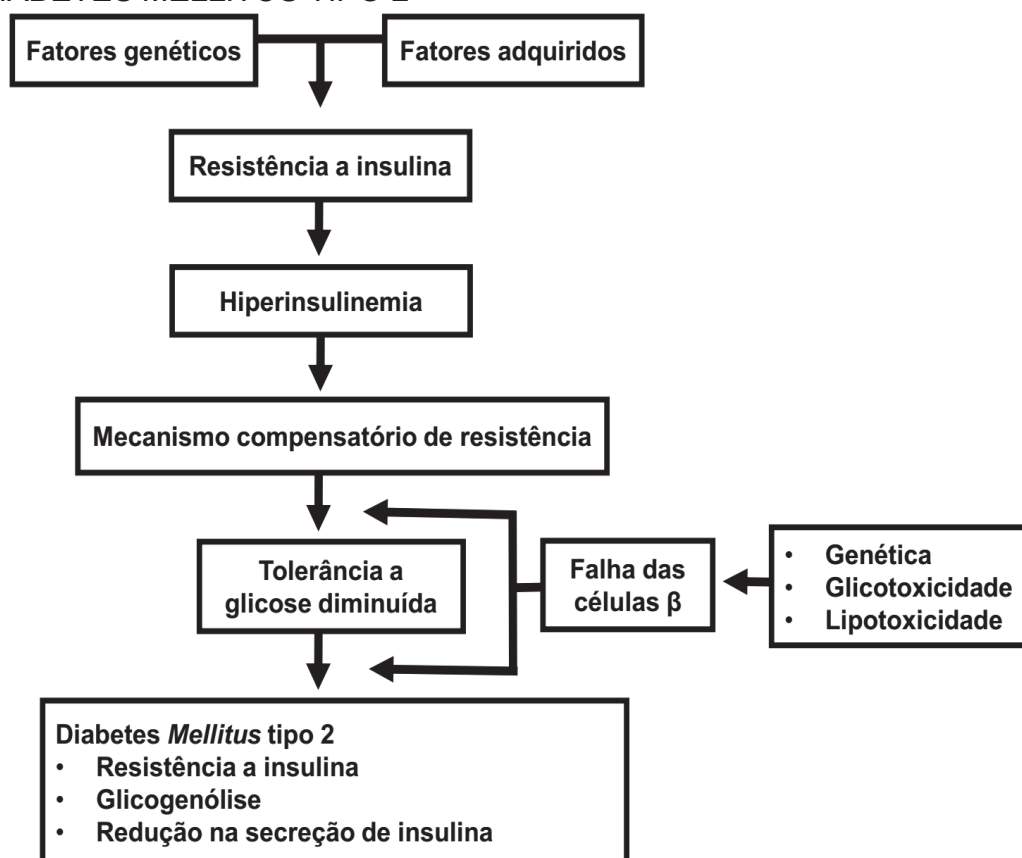
Outro fator predisponente para o DM2 é o diabetes *mellitus* gestacional (DMG) (GUELHO; PAIVA; CARVALHO, 2014; NOCTOR; DUNNE, 2015), caracterizado por uma intolerância à glicose de grau variado, sendo diagnosticado pela primeira vez no início da gravidez (segundo ou terceiro trimestre) (ADA, 2018). Após o parto, as condições normoglicêmicas podem ser reestabelecidas ou se a hiperglicemia persiste, a mulher passará a ser categorizada como portadora de DM2 (ADA, 2018). Vários estudos realizados apontaram que mais de 50% das gestantes diabéticas evoluíram para a forma de diabetes *mellitus* tipo 2 após o parto (LAPOLLA; DALFRÀ; FEDELE, 2008; MITANCHEZ et al., 2015; NOCTOR; DUNNE, 2015). Para o feto, as consequências seriam morbidade, mortalidade fetal, macrosomia fetal e o desenvolvimento de diabetes *mellitus* na fase adulta (MITANCHEZ; BURGUET; SIMEONI, 2014).

Além dos fatores genéticos que predis põem ao DM2, os fatores ambientes e estilo de vida também são gatilhos preditivos para o surgimento da doença (LOPEZ et al., 2014). De acordo com Petermann e colaboradores (2015), a etiologia principal das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), incluindo o DM, não se encontra em fatores genéticos e sim nos fatores de riscos ambientais e comportamentais, como o tabagismo, a obesidade, a dislipidemia, a inatividade física e a alimentação inadequada, entre outros (BANCO MUNDIAL, 2005). Por outro lado, Steck e Rewers, (2011) defendem que a susceptibilidade ao desenvolvimento do DM é mediada por

uma combinação de fatores genéticos e fatores ambientais (STECK; REWERS, 2011). Já Guelho e Carneiro (2013) descreveram que fatores genéticos, imunológicos e metabólicos contribuem para o desenvolvimento do DM2.

Diante de uma resistência à insulina, resultante de fatores genéticos e ambientais o organismo tenta se sobrepôr a esta condição de resistência, por meio do aumento na secreção da insulina, resultando em um estado de hiperinsulinemia, porém este mecanismo compensatório não é capaz de manter os níveis normoglicêmicos, resultando em um aumento nos níveis de glicemia denominado estado pré-diabético. Esta intolerância à glicose associada a uma disfunção das células β pancreáticas produtoras de insulina (defeito adquirido por meio da glicotoxicidade, lipotoxicidade e genéticos) resultam no desenvolvimento do DM2 (FIGURA 2) (HUPFELD; OLEFSKY, 2016).

FIGURA 2. APRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO DESENVOLVIMENTO DO DIABETES MELLITUS TIPO 2



Adaptado de HUPFELD; OLEFSKY, 2016 pg. 693.

A resistência à ação da insulina impede a propagação da transdução de sinais intracelulares, que envolve a auto-fosforilação da tirosina-quinase e de seus

substratos, que ativam proteínas relacionadas à síntese e translocação dos transportadores de glicose (GLUT 1-4) para a membrana celular. Desta forma, a inibição da translocação de transportador de glicose (GLUT) acarreta a redução da captação de glicose para o espaço intracelular nos músculos esqueléticos, resultando em uma condição/estado hiperglicêmico (ARSA et al., 2009).

A resistência à insulina (RI) é o fator dominante, subjacente e complexo para aumento dos casos de DM2 e este tipo de diabetes geralmente coexiste com outras patologias (HUPFELD; OLEFSKY, 2016). Indivíduos com DM2 normalmente apresentam patologias como a obesidade, hipertensão arterial sistêmica (HAS), dislipidemia, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e disfunção endotelial (ARSA et al., 2009; HAO et al., 2007). Cabe ressaltar que, dentre as possíveis causas apontadas para o desenvolvimento da resistência à insulina, destacam-se a obesidade (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011; WILCOX, 2005), mudanças na microbiota intestinal, chamado disbiose (MORAES et al., 2014) e alterações no metabolismo de lipídeos (SAMUEL; SHULMAN, 2013), mas provavelmente todos esses fatores estejam interligados em graus variados resultando em um estado de resistência à insulina (HUPFELD; OLEFSKY, 2016).

De acordo com Gregor e colaboradores (2011) os mecanismos para o desenvolvimento de resistência à ação da insulina são mediados pela inflamação de baixo grau induzida pela obesidade. Estudos realizados em tecido adiposo de seres humanos e em modelos animais (camundongo) obesos demonstraram que ocorre um acúmulo de macrófagos, e este acúmulo que é favorecido por quimiocinas, como a proteína quimioatraente para monócitos-1 (MCP-1) e a quimiocina denominada fator estimulante de colônias de macrófagos (MCF-1) que são secretadas por adipócitos (LUMENG; BODZIN; SALTIEL, 2007; WEISBERG et al., 2003).

Por sua vez, os macrófagos presentes no tecido adiposo apresentam uma elevada expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6, acompanhada pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e, tanto, as citocinas pró-inflamatórias como as EROs promovem a resistência à insulina. A citocina TNF- α por exemplo ativa cinases intracelulares, como a JNK e a I κ B cinase que inibem a sinalização do receptor de insulina por fosforilação em serina do substrato do receptor de insulina (IRS-1) ou seja, diminuem a sensibilidade à insulina e as EROs também promovem a ativação de fatores de transcrição como o AP-1 (proteína ativadora-1) e NF-KB (fator de transcrição kappa beta), exacerbando ainda

mais a expressão das citocinas inflamatórias, sua concentração circulante e seus efeitos sistêmicos (HUPFELD; OLEFSKY, 2016). Em indivíduos obesos, o conteúdo de macrófagos ativados é maior no tecido adiposo visceral do que subcutâneo, consistente com a hipótese de que a gordura visceral desempenha um papel mais proeminente na resistência à insulina (LUMENG; BODZIN; SALTIEL, 2007).

Provavelmente, o macrófago seja a célula efetora do sistema imune predominante responsável pela secreção de citocinas e resistência à insulina (JOHNSON; OLEFSKY, 2013). Mas, de acordo com outros estudos realizados, diferentes tipos de células imunológicas como os neutrófilos (TALUKDAR et al., 2012), mastócitos (LIU et al., 2009) linfócitos B (WINER et al., 2011), linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) (NISHIMURA et al., 2009) e células CD4⁺, Th1 (WINER et al., 2009) também estão envolvidas nessa complexa rede de comunicação celular que organiza a resposta inflamatória crônica presente na obesidade e no desenvolvimento de resistência à insulina (JOHNSON; OLEFSKY, 2013).

O processo da obesidade tem sido relacionado com fenômeno de disbiose que possui profundo impacto na fisiologia do hospedeiro e possivelmente em doenças metabólicas (BLUMBERG; POWRIE, 2012; BOULANGÉ et al., 2016; HILDEBRANDT et al., 2009; MORAES et al., 2014). A flora de animais obesos (ratos) apresentou majoritariamente bactérias do filo Firmicutes, que fermentam carboidratos complexos em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) os quais constituem fontes de energia e também podem desempenhar ações anti e próinflamatórias no organismo (TURNBAUGH et al., 2008). Resultados semelhantes em relação à constituição da microbiota intestinal também foram observados em humanos (LEY et al., 2006). Portanto, a presença de determinados filos de bactérias na composição da microbiota intestinal pode predispor ao desenvolvimento da obesidade, resistência à insulina e possivelmente DM (BLUMBERG; POWRIE, 2012). No entanto, ainda não está totalmente elucidado se a disbiose pode ser a causa ou resultado da obesidade (MORAES et al., 2014).

Outra causa que promove o processo de resistência à insulina é a lipotoxicidade (GLASS; OLEFSKY, 2012; HAO et al., 2007; SAMUEL; SHULMAN, 2013). Os pacientes obesos e/ou com DM2 apresentam níveis de ácidos graxos saturados circulantes frequentemente aumentados, e estes podem ativar mecanismos da imunidade inata como o receptor Toll-4 (TLR4) (SHI et al., 2006) em vários tipos celulares. Este receptor Toll-4 induz a ativação de JNK e Ikk que inibem a sinalização

de insulina via fosforilação do IRS-1, além de ativar o NF-KB e AP-1 (GLASS; OLEFSKY, 2012). Desta forma, há uma forte correlação entre lipotoxicidade como um fator contribuinte para a ativação de vias inflamatórias e resistência à insulina (SHI et al., 2006).

Outro lipídio envolvido no processo de resistência à insulina é o colesterol (BRUNHAM et al., 2007). A interrupção do efluxo de colesterol através do transportador ABCA1 presente nas células β pancreáticas resulta em um acúmulo de colesterol, o que acarreta na redução da secreção de insulina (DIRKX; SOLIMENA, 2012; HAO et al., 2007). Porém, as razões pelas quais as células β pancreáticas se tornam disfuncionais em algumas pessoas com aparecimento do DM, mas não em outras, ainda não estão totalmente esclarecidas (FRYIRS et al., 2010).

3.3. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DO DIABETES *MELLITUS*

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são as principais causas de morbimortalidade no mundo (DUNCAN et al., 2012). O DM destaca-se como uma das principais DCNT de maior ocorrência e atualmente existem 415 milhões de diabéticos no mundo entre 20 e 79 anos, com previsão para 642 milhões em 2040 (IDF, 2017). O DM encontra-se entre as principais causas de mortes no mundo, sendo responsável por 8,8% das mortes registradas em 2015 e projeta-se que em 2040 o percentual será 10,4% considerando a população mundial (OGURTSOVA et al., 2017). Apesar do DM apresentar um perfil epidêmico, milhões de pessoas ainda permanecem sem diagnóstico clínico do DM (SAYYID; FLESHNER, 2016).

De acordo com a Federação Internacional do Diabetes (2017), o Brasil tem uma população de cerca de 139.434 milhões de pessoas adultas e apresenta uma prevalência de 5 a 7% da população com DM, ou seja, em torno 7,6 milhões de portadores da doença (SBD, 2016). Já segundo a Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) realizada no ano de 2013, o país apresentou uma prevalência de 6,2% da população acima de 18 anos com DM. Em relação a prevalência por sexo, as mulheres representam a maior proporção (7,0%) de afetados em relação aos homens (5,4%), devido à busca por auxílio e assistência médica inerente ao maior autocuidado da mulher quando comparado ao homem e, independente do sexo, quanto maior a faixa

etária maior o percentual de incidência da doença (IBGE, 2014; PETERMANN et al., 2015).

Por fim, foi detectado que o maior número de casos de DM acometem indivíduos sem instrução ou ensino fundamental incompleto (IBGE, 2014). A importância de se obter conhecimento do nível de escolaridade dos portadores de DM está intimamente relacionada ao planejamento e execução das estratégias de educação para o autocuidado pessoal (FERREIRA; FERREIRA, 2009; PETERMANN et al., 2015).

O aumento da incidência de DM no Brasil e prevalência no sexo feminino também foi identificado em um estudo realizado com a população indígena Xavante do estado do Mato Grosso, onde é possível ressaltar que as mudanças no estilo de vida do indivíduo influenciaram diretamente no estado de saúde do mesmo, pois estes índios eram coletores e caçadores, e devido à conflitos com agricultores locais, passaram a ter acesso apenas a um território demarcado, o qual resultou em mudanças no hábito de vida tradicional, incorporação de alimentos industrializados, sedentarismo e, conseqüentemente, impactou negativamente no estado de saúde dos mesmos (FRANCO et al., 2014). Outro estudo de prevalência realizado no Brasil com a comunidade nipo-brasileira denota um ligeiro aumento na prevalência do DM. Em 1993 eram 18,3% de casos de DM, já no ano 2000 passou para 34,9%, mostrando o impacto das alterações no estilo de vida, padrões alimentares e susceptibilidade genética (ONKAMO et al., 1999; PETERMANN et al., 2015).

3.4 CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO E CONTROLE GLICÊMICO DO DIABETES MELLITUS.

O diabetes *mellitus* é uma doença complexa e existem diferenças marcantes na evolução entre os tipos de DM (ADA, 2017). Diabetes *mellitus* tipo 1 possui um início clínico abrupto, com hiperglicemia extrema e normalmente aguda, a qual é acompanhada por sintomas clássicos da doença (poliúria, polidipsia e polifagia) (SBD, 2016). O desenvolvimento do DM2 ocorre de forma lenta e em um período de tempo variável sendo observado estágios intermediários da doença que recebem a denominação de glicemia de jejum alterada (glicemia ≥ 100 mg/dL e < 126 mg/dL) e tolerância à glicose diminuída (após uma sobrecarga de 75 g de glicose, o valor de glicemia de 2 h situa-se entre 140 e 199 mg/dL) (estágios pré-diabéticos). Estes

estágios são decorrentes de uma combinação de resistência à ação insulínica e disfunção de célula β pancreáticas (SBD, 2016; THE INT EXP COMMITTEE, 2009).

Atualmente, quatro critérios são considerados para o diagnóstico do DM, três baseados na concentração da glicemia e a HbA1c (Tabela 2):

TABELA 2. VALORES DE GLICOSE PLASMÁTICA E HbA1c PARA DIAGNÓSTICO DE DIABETES MELLITUS

Categoria	Jejum*	2 h após ingesta de 75 de glicose	Casual**	HbA1c
Normoglicemia (mg/dL)	<100	<140	-	4,5 a 5,6%
Tolerância à glicose diminuída (mg/dL)	>100 a <126	≤ 140 a <200	-	5,7 e 6,4%
Diabetes mellitus (mg/dL)	≥ 126	≥ 200	≥ 200 (com sintomas clássicos)	$\geq 6,5\%$

*O jejum é definido como a ausência de ingesta calórica por no mínimo 8 h.

**Glicemia plasmática casual é aquela realizada a qualquer hora do dia, sem se observar o intervalo desde a última refeição.

Nota: o diagnóstico do DM deve sempre ser confirmado pela repetição do teste em outro dia, a menos que haja hiperglicemia inequívoca com descompensação metabólica aguda ou sintomas óbvios de DM.

Fonte: (SBD, 2015).

Historicamente, a glicemia de jejum tem sido parâmetro de diagnóstico do diabetes e deve ser realizada na ausência de ingesta alimentar de 8 horas, sendo a quantificação da glicemia realizada preferencialmente no plasma e refletindo o concentração da glicemia atual do indivíduo (SBD, 2016).

No ano de 2009 a utilização de hemoglobina glicada (HbA1c) foi proposta como critério de diagnóstico para o DM (THE INT EXP COMMITTEE, 2009). Segundo as Diretrizes da Sociedade Brasileira do Diabetes (SBD, 2016) e a Associação Americana de Diabetes (ADA, 2018) valor de HbA1c igual ou superior a 6,5% diagnostica caso de diabetes, desde que o valor se reproduza em uma segunda coleta. A dosagem de HbA1c ou A1c já é um parâmetro bioquímico considerado referência para o diagnóstico e “padrão ouro” para o monitoramento do DM, pois possibilita avaliação do controle glicêmico de um indivíduo diabético a longo prazo (AGUERO; DODOY; PINA, 2016; NETTO et al., 2009; SBD, 2016), sendo essencial na prática clínica para avaliação de estratégias terapêuticas, bem como de esforços para modificar ou reduzir fatores de risco que o indivíduo possa desenvolver

(AGUERO; DODOY; PINA, 2016; BUNN; GABBAY; GALLOP, 1978; RONALD KOLNING et al., 1976; SUMITA; ANDRIOLO, 2008).

A HbA1c reflete o histórico da glicemia do paciente referente a 120 dias prévios ao exame, que é o tempo médio de vida das hemácias (SBD, 2016). A reação de glicação da fração A1c ocorre pela ligação entre o grupo aldeído da glicose com o grupo amino do aminoácido valina da porção N-terminal da cadeia beta da hemoglobina por meio de uma ligação não-enzimática estável e irreversível (CAMARGO; GROSS, 2004; SBD; SBPC-ML; FENED, 2017).

3.4.1. Outros métodos de diagnóstico e avaliação do controle glicêmico

3.4.2.1 Dosagem 1,5 anidroglucitol (1,5 AG)

O 1,5-Anidroglucitol (1,5-AG) ou (1-deoxi-glicose) é o principal poliol circulante na corrente sanguínea (LU et al., 2003), derivado principalmente de fontes alimentares como cereais e carne, sendo absorvido pelo intestino, filtrado pelo glomérulo e reabsorvido pelos túbulos renais em condições normoglicêmicas (LI et al., 2017). Quando as concentrações de glicose excedem o limiar renal (aproximadamente 160-180 mg/dL), ocorre uma diminuição na concentração plasmática de 1,5-AG, em decorrência da competição com a glicose pelos mesmos receptores para reabsorção tubular (SBD, 2016), resultando assim, em maiores taxas de excreção urinária e diminuição nas concentrações séricas de 1,5-anidroglucitol (DUNGAN, 2008).

A dosagem de 1,5-AG como parâmetro bioquímico pós-prandial em pacientes portadores de diabetes *mellitus* desempenha um papel adjuvante no controle da doença, especialmente como um marcador de curto prazo, pois reflete a hiperglicemia de aproximadamente 1 semana para excursões hiperglicêmicas que ultrapassam o limiar renal, mas este exame ainda não é rotineiramente disponível na prática clínica (SBD, 2016). A avaliação deste biomarcador é especialmente útil em indivíduos diabéticos com hemoglobina glicada entre 6 e 8%, e valores plasmáticos acima de 10 mg/mL de 1,5-AG são indicativos de uma menor variabilidade no controle glicêmico quando comparados a indivíduos com valores de 1,5-AG abaixo de 5 mg/mL (SBD; SBPC-ML; FENED, 2017).

3.4.2.2 Frutosamina e Albumina Glicada (AG)

O processo de glicação de proteínas não se restringe apenas à formação de HbA1c, estende-se à diversas proteínas do organismo passíveis de glicação (SBD; SBPC-ML; FENED, 2017). Assim, além da HbA1c, existem outros testes para diagnóstico e avaliação do controle glicêmico em pacientes com DM, que seriam frutossamina e albumina glicada. Por se tratar de proteínas plasmáticas de *turnover* mais rápido que a HbA1c, podem ser consideradas marcadores bioquímicos precoces de oscilações glicêmicas (SBD, 2016).

As frutossaminas são cetoaminas compostos estáveis derivadas de bases de Schiff (aldíminas instáveis) formadas a partir de uma reação não enzimática irreversível entre um o grupo carbonil da glicose com o grupo amino da lisina presente em proteínas plasmáticas, principalmente na albumina. A concentração das frutossaminas está associada diretamente com a concentração de glicose das últimas três semanas (ARMBRUSTER, 1987; FEITOSA; ANDRADE, 2014; REIS et al., 2010). Portanto, as frutossaminas estão em concentrações elevadas na corrente sanguínea dos portadores de DM (ARMBRUSTER, 1987).

A dosagem de frutossaminas pode ser utilizada como um parâmetro auxiliar e alternativo à HbA1c quando fatores interferentes como por exemplo, indivíduos com distúrbios hematológicos, anemias ou hemoglobinopatias, afetam a dosagem da A1c (FEITOSA; ANDRADE, 2014). A anemia hemolítica, por exemplo, pode interferir significativamente na determinação da HbA1c, pois as hemácias sofrem hemólise precocemente e as hemácias jovens no sangue são menos afetadas pelo processo de glicação em relação às maduras, podendo configurar assim em um resultado falso negativo de HbA1c (SBD, 2016).

Os valores para a concentração plasmática de frutossamina são obtidos através da técnica laboratorial relativamente simples, de baixo custo e automatizável, porém ainda não há consenso sobre sua utilidade clínica (COHEN et al., 2003; SBD, 2016). Os valores de referência para frutossamina podem variar principalmente em pacientes com outras patologias concomitantes ao diabetes *mellitus* como por exemplo, complicações hepáticas, renais e doenças sistêmicas agudas, que afetam a síntese e depuração de proteínas (GROSS et al., 2002). No entanto os valores de referência para este analito em indivíduos diabéticos ainda não foram estabelecidos (SBD; SBPC-ML; FENED, 2017).

Outro potencial biomarcador para o diagnóstico e controle glicêmico de curto prazo, a albumina glicada (AG), também apresenta grande variação nos valores de referência (de 0,8-1,4 a 18-22%), devido à não padronização do teste laboratorial a ser usado (SBD; SBPC-ML; FENED, 2017). A AG reflete a média dos níveis glicêmicos das últimas duas a três semanas (ARASTEH et al., 2014), que se refere ao tempo de meia-vida da albumina na corrente sanguínea (SBD, 2016). Como a frutossamina, a dosagem da AG também pode sofrer algumas interferências e não está disponível para rotina laboratorial (FREITAS; EHLERT; CAMARGO, 2017; FURUSYO; HAYASHI, 2013).

3.5. COMPLICAÇÕES DO DIABETES *MELLITUS*

As complicações crônicas ocasionadas pelo diabetes *mellitus* são as principais responsáveis pela morbidade e mortalidade dos pacientes (BEM; KUNDE, 2006; GEHLING; CZERNIK; EBRAHEIM, 2016). A hiperglicemia prolongada é tóxica e promove o desenvolvimento de lesões orgânicas extensas e irreversíveis ao paciente no decorrer da doença (SBD; SBPC-ML; FENED, 2017).

Os pacientes diabéticos, tanto do tipo 1 como do tipo 2, podem desenvolver a longo prazo complicações microvasculares e macrovasculares. As complicações microvasculares ocasionam danos a pequenos vasos sanguíneos principalmente dos rins, olhos e extremidades e, por isso, são conhecidos como nefropatia diabética, retinopatia diabética (DR) e neuropatia diabética (DN) respectivamente. Já as complicações macrovasculares, atingem artérias e veias, tendo como consequências a disfunção cardiovascular, aumento da incidência de infarto agudo do miocárdio, a aterosclerose e acidente vascular cerebral (AVC) (TSCHIEDEL, 2014). Portanto, o retardo no diagnóstico do DM bem como no tratamento dos pacientes diabéticos está associado ao mal prognóstico, favorecendo o aparecimento precoce dessas complicações (DOMINGUETI et al., 2016).

A nefropatia diabética ou também denominada doença renal crônica do diabetes (DRD) é uma doença que ocasiona lesões glomerulares permanentes aos rins (LIM, 2014), sendo considerada uma das principais causas de insuficiência renal crônica (IRC) e um fator de risco independente para doenças cardiovasculares (BEM; KUNDE, 2006; DOMINGUETI et al., 2016). Cerca de 15 a 20% dos pacientes

portadores de DM2 e 30 a 40% com DM1 apresentam DRD (BEM; KUNDE, 2006; DOMINGUETI et al., 2016). A fisiopatologia da DRD não está totalmente elucidada (PAPATHEODOROU et al., 2015), mas é caracterizada por mudanças estruturais e funcionais nos rins, presença de albumina na urina (microalbuminúria e macroalbuminúria) e proteinúria e, em casos mais avançados da DRD, macrófagos e linfócitos estão presentes nos glomérulos renais caracterizando um quadro inflamatório do tecido (LIM, 2014). As complicações renais progridem mesmo com um controle glicêmico adequado (PAPATHEODOROU et al., 2015). O comprometimento glomerular inicia-se, geralmente, 5 a 10 anos após a evolução do DM, com maior incidência de DRD após 15 anos de doença (TSCHIEDEL, 2014).

Outro problema hegemônico do DM é a retinopatia diabética (RD), uma doença severa onde ocorre edema/descolamento retiniano, microaneurismas e hemorragias nos capilares oculares (CORRÊA; RALPH, 2005). A RD é a principal causa de cegueira no Brasil e no mundo decorrentes do DM e, de acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes (2016), 90% dos pacientes acometidos por DM1 e 60% daqueles com DM2 apresentarão algum grau de retinopatia ao longo do tempo da doença. O DM é um fator desencadeante de problemas visuais, aumentando 25 vezes a chance do indivíduo em perder a visão (SHRESTHA; KAITI, 2014). A melhor forma de prevenção no desenvolvimento da RD é o controle glicêmico dos pacientes (ANCOCHEA; SÁNCHEZ, 2016).

Já a neuropatia diabética, uma complicação tardia e comum do DM, afeta cerca de 28% dos pacientes com DM, acarretando comprometimento da percepção sensorial, motora e dos nervos autônomos dos membros inferiores e extremidades. Com a perda de sensibilidade, o paciente passa a apresentar lesões recorrentes nos membros inferiores (pés), que geralmente são agravadas através do uso de calçado inadequado, ou má postura do indivíduo, ocasionando rompimento do tecido epitelial e consequente infecção (SHEARMAN; RAWSHDEH, 2016).

Em relação a disfunção cardíaca, o DM promove a perda progressiva de células cardíacas, as quais são substituídas por uma matriz fibrótica, de modo que o coração torna-se incapaz de desempenhar suas funções adequadamente, resultando na condição denominada cardiomiopatia diabética (PAPPACHAN et al., 2013). A patogênese da cardiomiopatia diabética não está totalmente elucidada, mas a hiperglicemia, a dislipidemia e a inflamação desempenham papéis fundamentais na geração de espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio que estão diretamente

implicadas na disfunção contrátil do tecido cardíaco. A hiperglicemia do DM acomete de forma geral quase todos os tecidos do corpo e atua também como um fator independente principalmente para complicações cardiovasculares, mas o tabagismo, obesidade e hipertensão arterial também estão correlacionados (GRUNDY et al., 1999). As complicações cardiovasculares são responsáveis por 65% da mortalidade ocasionada nos indivíduos diabéticos (FROM; SCOTT; CHEN, 2010). Óbitos decorrentes de acidentes vasculares cerebrais muitas vezes não são relacionados como complicações do DM e os dados tornam-se subestimados e incompletos. Na Ásia 42% dos pacientes diabéticos foram à óbito devido à acidente vascular cerebral, enquanto na Austrália e Nova Zelândia, a porcentagem foi em torno de 59% (CHAN et al., 2009).

O paciente diabético em decurso da doença pode apresentar um maior risco para o desenvolvimento de depressão, transtornos de ansiedade e alimentares em relação à indivíduos não diabéticos, e isto está intimamente associado a um mau prognóstico (LONG et al., 2012; O'BRIEN et al., 2016; VALLIS, 2012). Uma das hipóteses que explica a grande incidência de depressão nos pacientes diabéticos pode estar associada a carga emocional muito grande sofrida de ansiedade e a prática relacionada ao autocuidado da doença, e isso torna-se um fator de predisposição a depressão, estando associado com comportamentos reduzidos de autocuidado, aumentando o mau controle glicêmico e o surgimento das complicações crônicas (ISMAIL, 2010). De acordo com trabalho de Long e colaboradores (2012), o risco de um paciente diabético desenvolver depressão é 3 vezes superior comparado a um indivíduo sem DM, e a coexistência de ambas as patologias piora notavelmente o prognóstico e as condições orgânicas do paciente.

3. 6 PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

O sangue é composto aproximadamente por 90% de água, sendo que 60% desta água juntamente com as proteínas compõem o plasma sanguíneo (BURNOUNF, 2007). As proteínas plasmáticas circulam através do sistema circulatório exercendo função de transporte, antioxidante, defesa do organismo, entre outros (TABELA 3) (MURAY et al., 2014).

De forma geral, além das proteínas plasmáticas, as proteínas oriundas dos diversos tecidos do corpo humano podem ser detectadas no sangue dependendo da

condição fisiopatológica do organismo (SUNDSTEN, 2008). A concentração circulante de insulina na corrente sanguínea em diferentes estágios do desenvolvimento do diabetes *mellitus* é um exemplo de como uma proteína plasmática reflete diretamente as alterações na fisiologia celular de um organismo (SUNDSTEN, 2008). Portanto, para a busca de potenciais biomarcadores para o diagnóstico ou alvos terapêuticos para várias doenças, o plasma é uma amostra extremamente interessante, além da fácil acessibilidade e obtenção (ANDERSON; ANDERSON, 2002).

TABELA 3. FUNÇÕES DAS DIFERENTES PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

FUNÇÕES	PROTEÍNAS PLASMÁTICAS
ANTIPROTEASES	Antiquimiotripsina, α_1 -Antitripsina α -2-macroglobulina e Antitrombina
COAGULAÇÃO SANGUÍNEA	Vários fatores de coagulação, fibrinogênio, protrombina
ENZIMAS	Atuação na corrente circulatória (fatores de coagulação, colinesterase) Extravasamento das células ou dos tecidos (aminotransferase)
HORMÔNIO	Eritropoetina
DEFESA IMUNE	Imunoglobulinas, proteínas do complemento e β_2 -Macroglobulina
PARTICIPAÇÃO EM RESPOSTA INFLAMATÓRIA	Proteínas da resposta de fase aguda (proteína C-reativa, α_1 -glicoproteína ácida, ceruloplasmina)
PROTEÍNAS DE TRANSPORTE OU DE LIGAÇÃO	Albumina (Vários ligantes, bilirrubina, ácidos graxos, íons $[Ca^{2+}]$, metais $[Cu^{2+}]$ $[Zn^{2+}]$), esteroides e uma variedade de outros hormônios), Globulina de ligação aos corticosteroides (transcortina) Haptoglobina (liga-se a hemoglobina extracopular), Lipoproteínas (quilomícrons, VLDL, LDL, HDL) Hemopexina (Continua)

	Proteína de ligação ao retinol Globulina de ligação aos hormônios sexuais (liga-se a testosterona e ao estradiol), Globulina de ligação aos hormônios tireoidianos (liga-se ao T ₄ e a T ₃), Transferrina (transporta o ferro) Transferretina (liga-se T ₄ e forma complexo com a proteína de ligação ao retinol)
--	--

Vários outros hormônios proteicos circulam na corrente circulatória, porém geralmente não são designados como proteínas plasmáticas.

(FONTE: Adaptado de Muray et al, 2014. Pg 672)

3.7 ANÁLISE PROTÊOMICA

No ano de 2003, a publicação do genoma humano foi um passo crucial que impulsionou pesquisas na área de biologia molecular (PIMENTA, 2003; RADIN, 2015) e permitiu avanços, principalmente, nos estudos de transcriptômica e proteômica (KAI et al., 2015).

O termo proteômica refere-se a detecção e identificação de um conjunto total de proteínas em uma determinada condição (BARBOSA et al., 2012; SHRUTHI; VINODHKUMAR; SELVAMANI, 2016). O estudo proteômico fornece informações qualitativas e quantitativas a partir da expressão de proteínas, sejam oriundas de uma organela celular ou de um organismo como um todo, considerando suas variações, atividades, mudanças ou modificações e interações com outras proteínas (FIALHO; MORENO; ONG, 2008; VALLEDOR; JORRÍN, 2011).

De acordo com Shruthi e colaboradores (2016), os estudos na área proteômica são de extrema importância tendo por objetivo monitorar a expressão proteica, compreender adequadamente diferentes mecanismos fisiológicos e patológicos, além de prever fatores de risco para o desenvolvimento de doenças. Os biomarcadores proteicos são potencialmente úteis, pois certas proteínas podem ser reguladas positivamente ou negativamente durante a progressão de um estado patológico, sendo assim a detecção destas diferenças nos níveis de expressão proteica torna-se extremamente importante para o prognóstico de uma doença (GRAVES; HAYSTEAD, 2002).

Já de acordo com Fialho e colaboradores (2008), o estudo proteômico apresenta uma maior complexidade em relação ao genômico, pois proteínas podem ser modificadas pós-traducionalmente por meio de mecanismos de fosforilação, glicosilação, ubiquitinação, sulfatação ou acetilação, bem como responder de forma diferenciada dependendo de sua localização celular, sofrer proteólise, desnaturação e rearranjo molecular dependendo do seu ligante e, de forma geral, uma única proteína pode estar envolvida em mais de um processo biológico ou inversamente e, funções similares podem ser executadas por diferentes proteínas. Portanto, um genoma pode apresentar muitos proteomas.

O campo da proteômica incorpora e requer um conjunto de tecnologias e técnicas analíticas significativamente avançadas, com alta seletividade e sensibilidade na área do diagnóstico de várias doenças, como por exemplo o câncer, Alzheimer, doenças cardiovasculares e doenças metabólicas como DM (SCHVARTZ et al., 2015; SLEDDER et al., 2014).

O estudo proteômico pode ser classificado em duas categorias, a bottom-up ou shotgun e a top-down (TD). O estudo bottom-up inclui separação das proteínas por eletroforese e as bandas proteicas são submetidas a digestão enzimática para que o conjunto de peptídeos obtido seja analisado por espectrometria de massas (MS). A análise bottom-up possui muitas vantagens como sensibilidade, reprodutibilidade em proteoma complexos como por exemplo em amostras de soro (BARBOSA et al., 2012). Já o top-down é um processo no qual as proteínas intactas, não digeridas enzimaticamente são submetidas à análise por MS (ARMIROTTI; DAMONTE, 2010).

Para examinar os níveis expressos diferencialmente de proteínas plasmáticas que estão associadas ao diabetes *mellitus* tipo 1 e tipo 2, foi utilizado nesta pesquisa uma abordagem baseada em proteômica do tipo bottom-up, com um método de análise unidimensional, a eletroforese (1D) em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), com posterior análise MALDI-TOF-MS, para se obter um painel de proteínas plasmáticas que foram expressas diferencialmente entre pacientes com DM1 e DM2 e grupo controle.

A eletroforese unidimensional SDS-PAGE surgiu nos anos 60, sendo uma técnica universalmente utilizada até os dias atuais na investigação biomédica e essencial na separação de proteínas de interesse em amostras biológicas complexas (CLEVELAND et al., 1977; RATH et al., 2009). A separação das proteínas por eletroforese SDS-PAGE em uma amostra complexa é dependente de alguns quesitos

como: peso molecular, carga global proteica da amostra, desnaturação proteica e campo elétrico. No sistema SDS-PAGE, o tampão incorpora o SDS e um agente redutor tiólico (β -mercaptoetanol) e este, por sua vez liga-se às proteínas para que estas adquiram uma razão uniforme entre a carga e massa, sendo assim separadas exclusivamente em função da sua massa molecular, as proteínas que tem menor peso molecular tendem a migrar mais facilmente por entre as malhas do gel de poliacrilamida (LAEMMLI, 1970).

Em estudos de proteoma comparativo, as proteínas visualizadas no gel de poliacrilamida são detectadas e quantificadas por análise densitométrica e aquelas que apresentam diferença de expressão em diferentes condições estudadas são submetidas à identificação através de espectrometria de massas, que caracteriza as moléculas através da relação massa/carga (m/z) (AEBERSOLD; MANN, 2003; ASSIS; JULIANO; JULIANO, 2011). De acordo com Assis e colaboradores (2011), um espectrômetro de massas consiste basicamente de três componentes: fonte de ionização para a obtenção de íons, um analisador de massas, cuja função é a separação dos íons e um detector destes íons integrado a um sistema de aquisição dos dados.

Na análise proteômica voltada para analitos de interesse clínico, o espectrômetro do tipo MALDI-TOF tem sido extensivamente empregado (CUNHA; CASTRO; FONTES, 2006). O termo MALDI significa a *ionização da amostra por dessorção a laser assistida por matriz*. Neste processo a amostra é co-cristalizada com uma matriz orgânica ácida (geralmente ácido α -ciano-4-hidroxicinamínico), a qual tem por finalidade fornecer prótons para a amostra. A transferência de prótons do analito é promovida pela incidência de um *laser*, comumente gás nitrogênio sobre a amostra/matriz depositada sobre uma placa metálica, o que resulta em peptídeos ou proteínas ionizadas e concomitantemente dessorvidos dessa placa (EMIDIO et al., 2015).

Os íons peptídicos dessorvidos são acelerados para o analisador de massas TOF (*Time of flight*- tempo de voo), que é um tubo à vácuo, no qual a velocidade de voo do analito é inversamente proporcional à sua massa. Portanto, analitos de menor massa atingem o detector em um tempo menor quando comparados com os analitos de maior massa. O detector converte o sinal iônico em sinal análogo, que é lido e interpretado por uma estação de trabalho, e como resultado final da análise é gerado um gráfico de massa m/z versus intensidade (contagem de íons), comumente

chamado de espectro MS (BARBOSA et al., 2012). Os espectros MS obtidos são comparados com informações disponíveis em bancos de dados, o que permite identificar a proteína de interesse (BARBOSA et al., 2012).

3.7.1 Biomarcadores proteicos relacionados ao Diabetes *Mellitus*

A proteômica clínica visa identificação e caracterização de novos biomarcadores proteicos para prática laboratorial (SUNDSTEN; ORTSATER, 2009). Um biomarcador é uma substância utilizada como indicador do estado orgânico de um indivíduo, seja em uma condição de saúde ou doença, sendo usado para fins de diagnóstico e/ou monitoramento da doença (ANDERSON et al., 2004).

Existem diferentes tipos de biomarcadores biológicos em diversos biofluidos complexos do organismo, como proteínas plasmáticas, urinárias, salivares, lacrimais, proteínas no líquido sinovial, proteínas do líquido cefalorraquidiano, marcadores genéticos de predisposição/susceptibilidade ou proteção ao desenvolvimento da doença e metabólitos como os produtos de glicação avançada (CHUNG et al., 2016; SUNDSTEN; ORTSATER, 2009).

Os biomarcadores proteicos estão ganhando cada vez mais notoriedade nas pesquisas biomédicas e atualmente várias proteínas com as mais diversas funções estão sendo consideradas novos potenciais biomarcadores do DM (TABELA 4). O aumento ou diminuição na expressão de uma proteína pode indicar modificações biológicas importantes no organismo (RIAZ; ALAM; AKHTAR, 2010).

TABELA 4. PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS EM DIABÉTICOS

Categoria da proteína	Nome da proteína	Expressão em diabéticos
Citocinas	IL ₆	+
	TNF- α	+
Proteínas relacionadas ao metabolismo dos lípidos e lipoproteínas	Apolipoproteína E	+
	Apolipoproteína A-I	—
	Apolipoproteína A-II	—
	Apolipoproteína B	+
	Apolipoproteína H	—
	Apolipoproteína C ₁ C ₂	—
	Lipase lipoproteica (LPL)	+
	Proteína de transferência de éster de colesterol (CEPT)	+
Proteínas plasmáticas de transporte e inflamatórias	Proteína C reativa	+
	α -2-Macroglobulina	+
	Haptoglobina	+
	Ceruloplasmina	+
	Albumina	+
	α -1-antitripsina	+

(+): Aumento da expressão da proteína.

(-): Diminuição da expressão da proteína.

Fonte: Adaptado de RIAZ; ALAM; AKHTAR, 2010.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. COMITÊ DE ÉTICA

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Paraná – Setor de Ciências da Saúde/SCS, sob o CAAE nº 01038112.0.0000.0102.

4.2. OBTENÇÃO DA AMOSTRAS ANALISADAS

As amostras de sangue dos pacientes portadores de DM1 e DM2 foram coletadas durante exames de rotina realizados pelo laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas (HC-UFPR). Os exames laboratoriais e clínicos complementares bem como os dados antropométricos dos pacientes diabéticos foram obtidos dos prontuários médicos eletrônicos do HC-UFPR. As amostras de sangue dos indivíduos não diabéticos, designados como grupo controle, foram obtidas no banco de sangue do HC-UFPR. Os grupos amostrais foram separados de acordo com a classificação do DM atual (ADA,2017) e subdivididos baseando-se no controle glicêmico dos indivíduos através da avaliação dos valores de HbA1c (TABELA 5).

TABELA 5. AMOSTRAS DE PLASMA AGRUPADAS DE ACORDO COM OS NÍVEIS DE HEMOGLOBINA GLICADA

GRUPOS	QUANTIFICAÇÃO DE HB1AC (%)	CONTROLE GLICÊMICO	TAMANHO AMOSTRAL (n)
DM1	≥ 7	mau	10
DM1	< 7	bom	10
DM2	≥ 7	mau	10
DM2	< 7	bom	10
Indivíduos não-diabéticos	$< 6,5$	bom	10

As amostras de sangue foram coletadas em tubo a vácuo contendo anticoagulante EDTA e submetidas a centrifugação durante 20 minutos a 3500 x g, a

4°C. Após a centrifugação, os plasmas foram separados e armazenados a -20°C até o momento da extração das proteínas plasmáticas abundantes. Para extração, os plasmas dos pacientes foram descongelados em temperatura ambiente e agrupados de acordo com o tipo de diabetes (DM1 e DM2) e subgrupados com base nos valores de Hb1Ac abaixo e acima de 7%, que indicam bom e mau controle glicêmico, respectivamente. Cada grupo foi composto por um agregado de 10 amostras de plasma e para cada agregado, 6 µl do mix inibidor de protease (GE Healthcare, EUA) foram adicionados para amenizar a degradação da amostra.

4.3. EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

A extração das proteínas plasmáticas mais abundantes (albumina e imunoglobulinas) dos referidos grupos em estudo foi realizada através de duas metodologias, com o Kit comercial Proteome Purify™ 2 (Sigma-Aldrich, EUA) e com acetona 50% (v/v).

Para a extração das proteínas por meio do Kit Proteome Purify™ 2, 10 µl de cada *pool* de plasma foram pipetados em tubo Spin-X Filter juntamente com 1 mL da resina de imunodepleção. Os tubos foram submetidos a homogeneização por 60 minutos em homogeneizador hematológico. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 2.000 x *g*. O volume final do filtrado foi aproximadamente 500 µl, o qual foi transferido para microtubo 1,5 mL *LoBind* (Eppendorf) e armazenamento a -20°C até o momento da eletroforese.

Para a extração das proteínas plasmáticas em solvente orgânico acetona 50% (v/v), 12,3 µl do agregado plasmático foram pipetados em microtubo *LoBind* para proteínas juntamente com 50 µl de tampão fosfato-salino 1x (PBS Phosphate buffered saline) e 150 µl de acetona 50% (v/v) e incubado por 2 horas a -20°C. Em seguida, o microtubo foi centrifugado por 30 minutos a 10 mil x *g*, a 4°C, e o sobrenadante e o precipitado foram separados para novos microtubos *LoBind* e armazenados a -20°C até o momento da eletroforese (JIANG; HE; FOUNTOULAKIS, 2004).

4.4. DOSAGEM DAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

A concentração das proteínas plasmáticas após as extrações descritas anteriormente, foi determinada pelo método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay; Bio Rad Laboratório, Hercules, EUA) utilizando como padrão a albumina de soro bovino (BSA) (Sigma-Aldrich, EUA) (BRADFORD, 1976).

4.5.ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL DESNATURANTE (SDS-PAGE)

A separação das proteínas plasmáticas foi realizada através de eletroforese unidimensional desnaturante (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970) em mini-cuba vertical (HOEFLER, SE 260) conforme a metodologia descrita por *Laemmli* (1970). Para cada grupo (TABELA 5), 15 µg de proteínas previamente solubilizadas em tampão de amostra 5x (Tris-HCl pH 6,8 60 mM, glicerol 25%, SDS 10%, β-mercaptoetanol 14,4 mM, azul de bromofenol) foram aplicadas em cada poço, com volume final de 15 µl.

A corrida eletroforética foi realizada com gel de poliacrilamida 10%, a uma diferença de potencial de 150 V e corrente elétrica livre durante 90 minutos. Após a corrida, as bandas proteicas foram reveladas com coloração *PhastGel® Blue R* (GE Healthcare, EUA) e *Blue Silver G*, e o *background* dos géis foram removidos através de sucessivas lavagens com água destilada. Para cada condição, uma triplicata de géis foi realizada.

4.6. CAPTURA DAS IMAGENS DOS GÉIS DE POLIACRILAMIDA E ANÁLISE DENSITOMÉTRICA

Após a revelação das bandas proteicas, os géis foram digitalizados utilizando o fotodocumentador L-PIX (Loccus Biotecnologia, Brasil) e o volume relativo (Vol.%) das bandas de interesse foi determinado através programa *LabImage 1D* (Loccus Biotecnologia, Brasil).

4.7. CLIVAGEM DAS PROTEÍNAS POR TRIPSINIZAÇÃO DAS BANDAS PROTEICAS E ESPECTROMETRIA DE MASSA

As bandas proteicas, que apresentaram ou não diferenças de expressão, foram excisadas do gel, descoradas com 400 µL de acetonitrila (ACN) 50% (v/v), NH_4HCO_3 25 mM, desidratadas uma vez com ACN 100% por 5 minutos, com posterior evaporação da acetonitrila residual em fluxo laminar. Os pedaços de gel foram embebidos com 10 µL de tripsina 20 ng em NH_4HCO_3 40 mM e incubados em banho de gelo por 30 minutos. A digestão trípica ocorreu por 16-18 horas a 37 °C. Os peptídeos resultantes (1 µl) foram co-cristalizados com 1 µl da matriz de ácido ciano-4-hidroxicinâmico (4HCCA) em ACN 50% (v/v), TFA 0,1% (v/v) sobre placa metálica específica para identificação por espectrometria de massa MALDI-TOF (*Bruker Daltonics*, Alemanha).

4.8. OBTENÇÃO E ANÁLISE DOS ESPECTROS DE MASSAS

As massas dos peptídeos trípticos foram determinadas utilizando um Espectrômetro de massas MALDI-TOF (*Bruker Daltonics*, Alemanha). E os resultados foram analisados pelo software FlexControl (*Bruker Daltonics*, Alemanha). Os espectros foram obtidos no modo refletor positivo, com uma voltagem de aceleração de 20 kV, intervalo de 150 ns entre o pulso de laser e aplicação da voltagem, e massa de aquisição entre 800 – 3200 Da. Para a análise e tratamento dos espectros foi utilizando o software FlexAnalysis 3.0 (*Bruker Daltonics*, Alemanha).

4.9. IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

A identificação de proteínas foi realizada na plataforma *Mascot* disponível no endereço eletrônico www.matrixscience.com. A plataforma *Mascot* foi alimentada com os seguintes parâmetros de busca: carga dos peptídeos protonados +1, peptídeos trípticos com uma possibilidade de perda de um sítio de clivagem trípica, tolerância máxima permitida de erro na massa 200 ppm e oxidação da metionina como modificação variável das proteínas. A partir desses critérios, o *Mascot* gera a comparação por homologia de massa de peptídeo e sequência de aminoácidos em bancos de dados de proteínas não redundantes do *NCBI*.

4.10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados dos parâmetros antropométricos e bioquímicos dos grupos em estudo foram submetidos à análise do Teste de Tukey e as comparações entre os volumes relativos das bandas de proteicas foram realizadas pelo teste t Student. Uma probabilidade (P) inferior a 5% ($P < 0,05$) foi considerada significativa em todas as análises. O programa Statistica para Windows 10.0 (StatSoft, Inc. Tulsa, OK) foi utilizado para as comparações estabelecidas.

Em relação as análises estatísticas para o volume relativo das bandas proteicas diferencialmente expressas, os resultados foram apresentados como média e as barras verticais são os intervalos de confiança de 95%. Os intervalos de confiança são usados para indicar a confiabilidade de uma estimativa (FIELD; MILES; FIELD, 2009).

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS E BIOQUÍMICAS DOS GRUPOS ESTUDADOS

Os valores dos dados antropométricos de índice de massa corpórea (IMC), tempo de doença e os dados bioquímicos de colesterol, HDL-c, LDL-c, triglicerídeo e creatinina entre os grupos e subgrupos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (TABELA 6). Já a glicemia em jejum do grupo controle foi significativamente inferior (97 ± 3 mg/dL) em relação aos grupos DM1 com mau controle glicêmico (304 ± 57 mg/dL) e ao DM2 com mau controle glicêmico (267 ± 35 mg/dL).

TABELA 6. DADOS ANTROPOMÉTRICOS E BIOQUÍMICOS DOS GRUPOS DM1, DM2 E CONTROLE

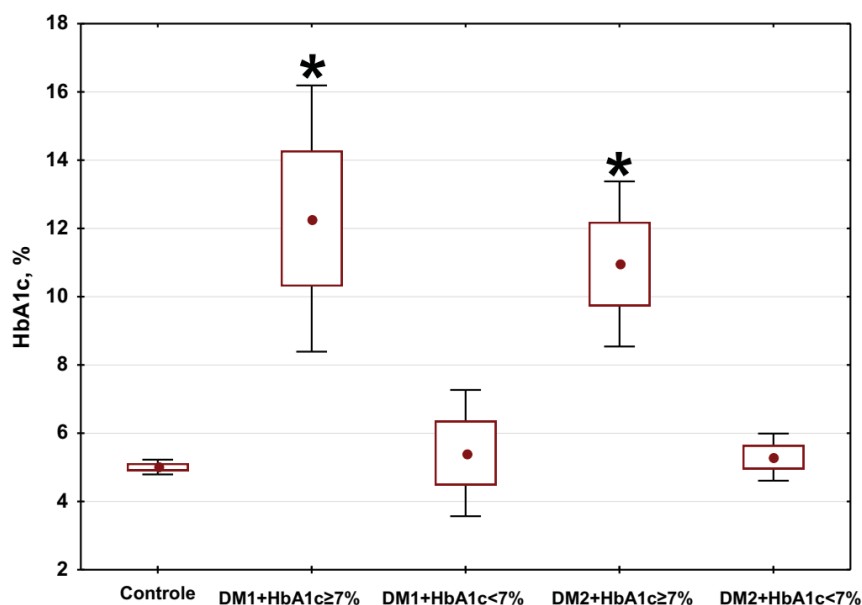
GRUPOS	DM1		DM2		CTRL [#]
Dados CTRL glicêmico	HbA1c ≥7%	HbA1c <7%	HbA1c ≥7%	HbA1c <7%	HbA1c <7%
HbA1c (%)	$12,2 \pm 1^b$	$5,4 \pm 0,9^a$	$10,0 \pm 1^b$	$5,0 \pm 0,3^a$	$5 \pm 0,1^a$
Glicose (mg/dL)*	304 ± 57^d	108 ± 27^b	267 ± 35^c	105 ± 10^b	97 ± 3^b
IMC (kg/m ²)**	26 ± 6^c	25 ± 3^c	27 ± 5^c	28 ± 4^c	25 ± 2^c
Tempo (anos)***	16 ± 5^f	15 ± 13^f	14 ± 8^f	13 ± 3^f	-
Colesterol (mg/dL)	187 ± 69^d	165 ± 21^d	191 ± 43^d	176 ± 38^d	177 ± 45^d
HDL-c mg/dL	50 ± 9^e	51 ± 15^e	46 ± 13^e	46 ± 8^e	54 ± 11^e
LDL-c mg/dL	102 ± 39^f	90 ± 18^f	111 ± 35^f	103 ± 32^f	101 ± 33^f
Triglicerídeo mg/dL	171 ± 181^g	119 ± 65^g	176 ± 152^g	132 ± 67^g	107 ± 59^g
Creatinina mg/dL	$0,95 \pm 0,24^h$	$1,59 \pm 2^h$	$1,02 \pm 0,21^h$	$0,86 \pm 0,08^h$	$0,77 \pm 0,23^h$
Albumina g/dL	$3,7 \pm 0,49^m$	$4,26 \pm 0,42^l$	$3,8 \pm 0,22^l$	$4,2 \pm 0,23^j$	$3,9 \pm 0,2^l$

CTRL*: indivíduos com diagnóstico negativo para DM, DM1+HbA1c≥7%: Grupo com diabetes *mellitus* tipo 1 com mau controle glicêmico, DM1+HbA1c<7%: Grupo com diabetes *mellitus* tipo 1 com bom controle glicêmico, DM2+HbA1c≥7%: Grupo com diabetes *mellitus* tipo 2 com mau controle glicêmico, DM1+HbA1c<7%: Grupo com diabetes *mellitus* tipo 2 com bom controle glicêmico. Os valores são médias e desvios-padrões dos dados bioquímicos. Médias seguidas por letras idênticas a letra do controle (não-diabéticos) não são significativamente diferentes ($p>0,05$) de acordo com o teste Tukey.

Os valores de Hb1Ac para os grupos DM1 e DM2 com mau controle glicêmico ($12,2 \pm 1\%$) ($10,0 \pm 1\%$) foram significativamente superiores em relação aos grupos DM1 e DM2 com bom controle glicêmico e grupo controle. A albumina apresentou um valor menor ($3,7 \pm 0,49$ mg/dL) no grupo DM1 com mau controle glicêmico, o qual é estatisticamente significativo em relação ao grupo DM1 e DM2 com bom controle glicêmico (TABELA 6).

Como observado, (TABELA 6) os grupos em estudo DM1 e DM2 com o mau controle glicêmico apresentaram uma concentração da hemoglobina glicada aproximadamente cinco vezes superior em relação aos grupos com bom controle glicêmico e o grupo controle, cujos indivíduos foram selecionados justamente com o objetivo de avaliar o impacto dessa diferença sobre a expressão das proteínas plasmáticas (FIGURA 3).

FIGURA 3. VALORES DE HEMOGLOBINA GLICADA NOS DIFERENTES GRUPOS EM ESTUDO



Controle: indivíduos com diagnóstico negativo para DM; DM1+HbA1c≥7%: Grupo com diabetes *mellitus* tipo 1 com mau controle glicêmico; DM1+HbA1c<7%: Grupo com diabetes *mellitus* tipo 1 com bom controle glicêmico; DM2+HbA1c≥7%: Grupo com diabetes *mellitus* tipo 2 com mau controle glicêmico; DM2+HbA1c<7%: Grupo com diabetes *mellitus* tipo 2 com bom controle glicêmico. Os círculos fechados indicam as médias, o quadrado 1-desvio padrão e as barras horizontais 2-desvios padrões. O asterisco (*) representa diferença estatística entre os grupos diabéticos.

5.2 ANÁLISE COMPARATIVA DAS METODOLOGIAS EMPREGADAS PARA REMOÇÃO A REMOÇÃO DAS PROTEÍNAS MAIS ABUNDANTES DO PLASMA: KIT PROTEOME PURIFY 2 E ACETONA 50% (V/V)

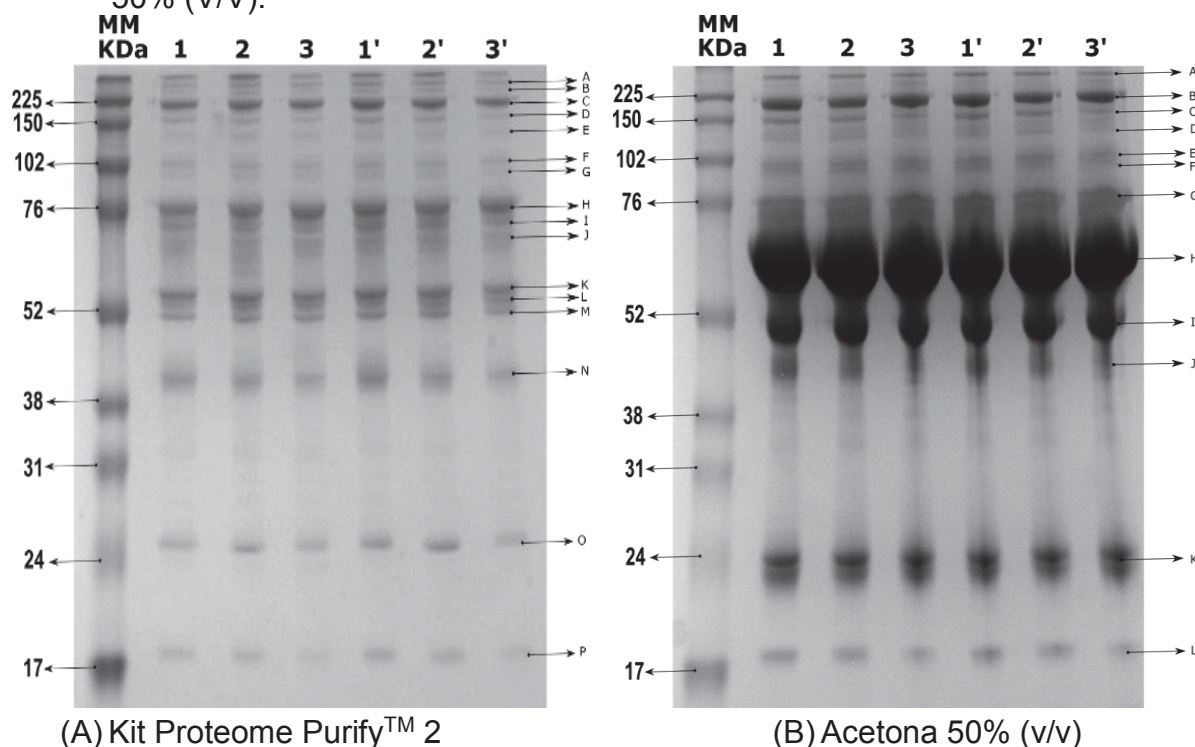
O plasma sanguíneo é uma amostra complexa e rica em proteínas, onde certas proteínas são extremamente abundantes como albumina e imunoglobulina G (IgG) e representam aproximadamente 70% do teor total de proteínas plasmáticas (ANDERSON; ANDERSON, 2002).

Desta forma, para estudos com abordagem proteômica, faz-se necessário a utilização de metodologia para a remoção de proteínas mais abundantes do plasma a fim de identificar potenciais biomarcadores proteicos menos abundantes. Para isto, dois métodos de extração, o Kit de imunodepleção de albumina e IgG (Sigma-Aldrich, EUA) e o método de extração com acetona 50% (v/v) (THONGBOONKERD et al., 2002) foram testados a fim de avaliar efetividade na remoção das proteínas mais abundantes, resolução das bandas e melhor reprodutibilidade dos resultados.

As amostras de plasma tratadas com o kit proteome purify™ 2 apresentaram uma concentração menor de proteínas totais ($0,18 \mu\text{g}/\mu\text{L} \pm 0,07$) em relação a metodologia utilizando acetona 50% (v/v) na fração sobrenadante ($2,09 \mu\text{g}/\mu\text{L} \pm 0,48$). Além disso, as corridas eletroforéticas mostraram que o kit proteome purify™ 2 removeu eficientemente a albumina do plasma, pois considerando o peso molecular da albumina em torno de 66 kDa, foi possível visualizar uma diminuição na intensidade e volume da banda justamente na região entre 76 a 38 KDa do gel 1D SDS-PAGE (FIGURA 4A), o que não foi observado na corrida eletroforética da amostra de plasma tratado com acetona fração sobrenadante (FIGURA 4B).

Cabe ressaltar que, o perfil eletroforético do *pool* proteínas plasmáticas de pacientes com DM1 com bom e mau controle glicêmico e o controle apresentou 16 bandas proteicas obtidas pelo método de imunodepleção (FIGURA 4 A). Já o perfil eletroforético para as amostras proteicas DM1 com mau e bom controle glicêmico e o controle tratadas com acetona 50% (v/v) foi possível visualizar 12 bandas proteicas (FIGURA 4 B).

FIGURA 4. PERFIL ELETROFORÉTICO DO *POOL* PROTEÍNAS PLASMÁTICAS DO GRUPO DM1 TRATADAS COM KIT DE IMUNODEPLEÇÃO E ACETONA 50% (V/V).

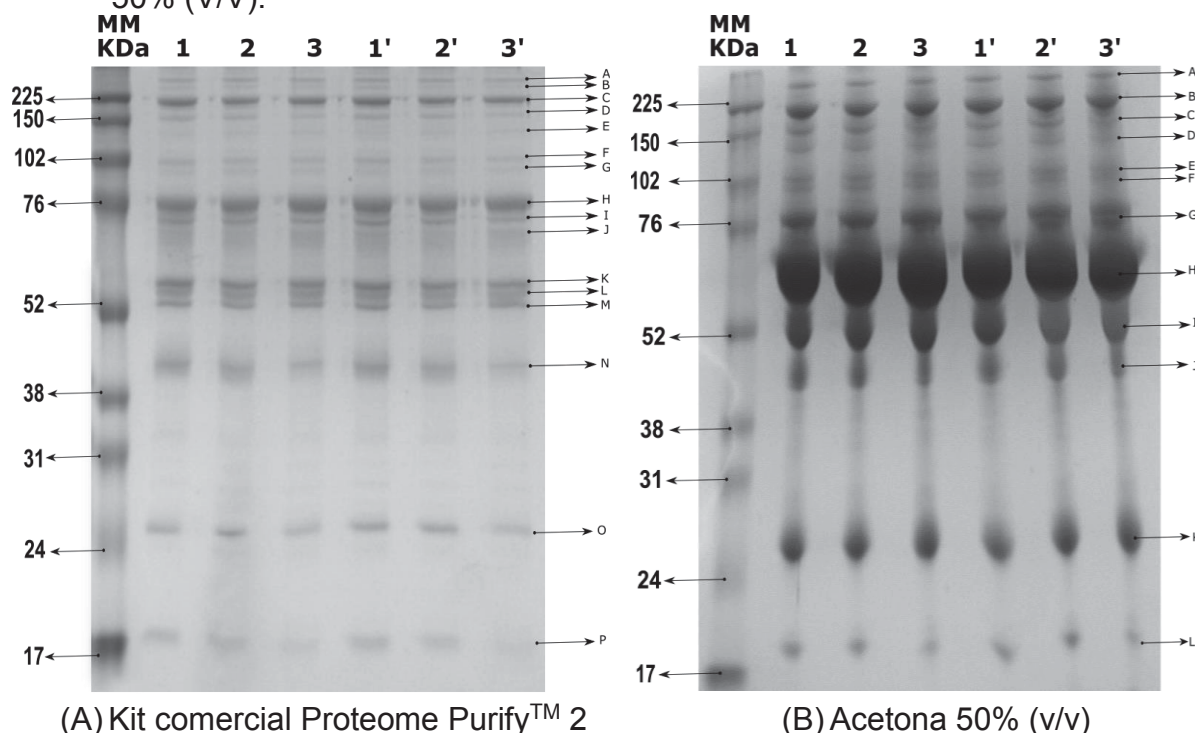


MM: padrões de peso molecular de proteínas. (a) bandas de proteínas reveladas com *Blue Silver*: Linha 1, *pool* de proteínas plasmáticas de pacientes DM1 com mau controle glicêmico (HbA1c $\geq 7\%$); Linha 2, *pool* de proteínas plasmáticas de pacientes DM1 com bom controle glicêmico (HbA1c $< 7\%$); Linha 3, *pool* de proteínas plasmáticas de indivíduos sem DM. Linhas 1', 2' e 3' são repetições das respectivas condições previamente descritas. O gel representa triplicata da técnica.

Através de análise visual, foi possível identificar diferenças de intensidade em algumas bandas proteicas, considerando as duas metodologias de tratamento das amostras abordadas no presente estudo (FIGURA 4). Na corrida eletroforética do *pool* de proteínas plasmáticas do grupo DM1 tratadas com Kit Proteome Purify™ 2, foi possível visualizar a diferença de intensidade nas bandas proteicas designadas pelas letras C, D, N, O e P, sendo que o grupo de pacientes diabéticos com bom e mau controle glicêmico apresentaram bandas mais intensas em relação ao grupo controle (FIGURA 4 A). As bandas B, C e L referente ao perfil eletroforético do *pool* de proteínas plasmáticas do grupo DM1 tratadas com acetona 50% (v/v) (FIGURA 4B) também foram mais intensas no grupo de pacientes diabéticos em relação ao controle.

Para os *pools* de proteínas plasmáticas do grupo DM2 com bom e mau controle glicêmico e o controle, os perfis eletroforéticos apresentaram também 16 bandas proteicas obtidas por imunodepleção (FIGURA 5 A) bem como 12 bandas proteicas após tratamento com acetona 50% (v/v) (FIGURA 5 B).

FIGURA 5. PERFIL ELETROFORÉTICO DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS DO GRUPO DM2 TRATADAS COM KIT DE IMUNODEPLEÇÃO (A) E ACETONA 50% (V/V).



MM: padrões de peso molecular de proteínas. (Linha 1, *pool* de proteínas plasmáticas de pacientes DM1 com mau controle glicêmico (HbA1c $\geq 7\%$); Linha 2, *pool* de proteínas plasmáticas de pacientes DM1 com bom controle glicêmico (HbA1c $< 7\%$); Linha 3, *pool* de proteínas plasmáticas de indivíduos sem DM. Linhas 1', 2' e 3' são repetições das respectivas condições previamente descritas. O gel representa triplicata técnica.

Na corrida eletroforética do grupo DM2 tratada com Kit Proteome Purify™ 2, foi visualizada diferença de intensidade nas bandas proteicas designadas pelas letras C, D, N, O e P, as quais foram mais intensas nos grupos DM2 com bom e mau controle glicêmico em relação ao grupo controle (FIGURA 5 A). O mesmo foi observado para as bandas B, C e L referente ao perfil eletroforética do agregado de proteínas plasmáticas do grupo DM2 tratadas com acetona 50% (v/v) (FIGURA 5 B).

5.3. IDENTIFICAÇÃO DAS BANDAS PROTEICAS DO GRUPO DM1, DM2 E CONTROLE TRATADOS COM KIT PROTEOME PURIFY™ 2 POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DO TIPO MALDI-TOF

Todas as bandas proteicas obtidas a partir da corrida eletroforética do grupo DM1, DM2 e grupo controle tratados com o Kit Proteom Purify™ 2 foram analisadas e identificadas por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF (TABELA 7).

TABELA 7. IDENTIFICAÇÃO DAS BANDAS PROTEICAS DOS GRUPO DM1 E DM2 COM MAU E BOM CONTROLE GLICÊMICO E GRUPO CONTROLE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DO TIPO MALDI-TOF

BANDA/POOL	DM1/DM2 HbA1c≥7%	DM1/DM2 HbA1c<7%	CONTROLE
A/B	-----	-----	-----
C	Alfa-2-Macroglobulina	Alfa-2-Macroglobulina	Alfa-2-Macroglobulina
D	Celuroplasmina	Celuroplasmina	Celuroplasmina
E/F/G	-----	-----	-----
H	Transferrina	Transferrina	Transferrina
I	Complemento C3	Complemento C3	Complemento C3
J	Hemopexina	Hemopexina	Hemopexina
K	Fibrinogênio beta	Fibrinogênio beta	Fibrinogênio beta
L	Alfa-1-Antitripsina	Alfa-1-Antitripsina	Alfa-1-Antitripsina
M	Fibrinogênio gama	Fibrinogênio gama	Fibrinogênio gama
N	Haptoglobina	Haptoglobina	Haptoglobina
O	ApoA-I*	ApoA-I*	ApoA-I*
P	Haptoglobina	Haptoglobina	Haptoglobina

ApoA-I: Apolipoproteína A-I

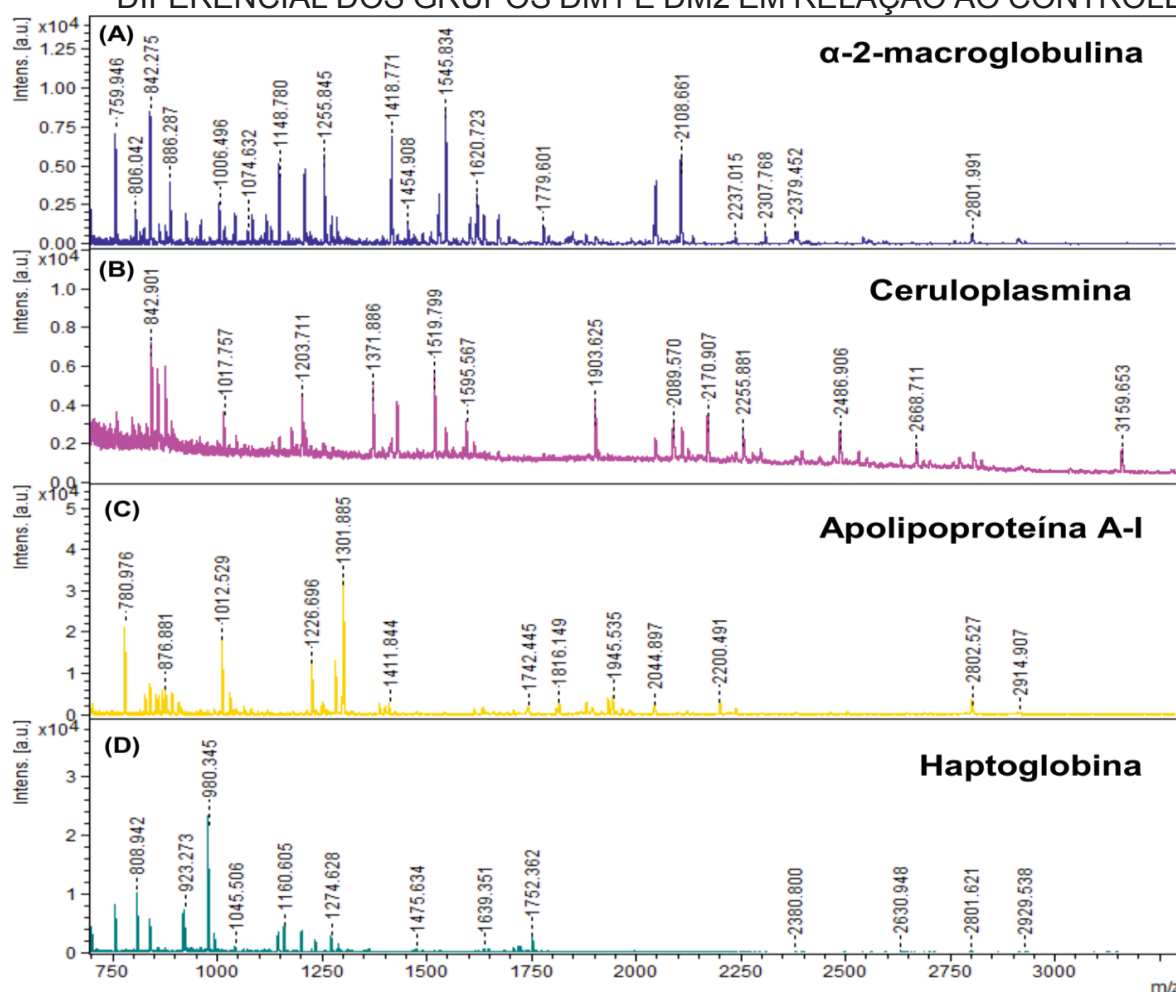
(-----): sem identificação.

FONTE: O Autor, 2018.

Pela análise visual, as bandas C, D, O, N e P apresentaram diferenças de intensidade entre os grupos de diabéticos e o grupo controle. A banda proteica designada com a letra C foi identificada como sendo a proteína α -2-macroglobulina (α -2-M) para todos os grupos em estudo (grupo DM1 e DM2 com mau e bom controle glicêmico e grupo controle/não diabéticos), a banda proteica designada pela letra D foi identificada como proteína ceruloplasmina (CP), a banda proteica designada com a letra N e P foram identificadas como Haptoglobina (Hp) e a banda proteica O foi identificada como apoA-I (TABELA 7).

A figura 6 apresenta os espectros de m/z referente as bandas proteicas que apresentaram, visualmente, diferenças de intensidade nos grupos DM1 e DM2 em relação ao grupo controle. O eixo da abscissa representa a relação m/z e o eixo das coordenadas representa a intensidade (nº de vezes que o íon atinge o detector) dos picos dos peptídeos tripticos. Os dados referente a identificação das proteínas como score, cobertura de sequência, número de peptídeos buscados e pareados e erro de pareamento estão compilados no anexo I.

FIGURA 6. ESPECTROS DE MASSA/CARGA (m/z) REPRESENTATIVOS PARA ALGUMAS BANDAS DE PROTEÍNAS COM POTENCIAL EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS GRUPOS DM1 E DM2 EM RELAÇÃO AO CONTROLE.



Os picos representam os peptídeos das proteínas obtidas pela ação proteolítica da enzima tripsina.
FONTE. O autor (2018).

5.4. IDENTIFICAÇÃO DAS BANDAS PROTEICAS DO GRUPO DM1, DM2 E CONTROLE TRATADOS COM ACETONA 50% (V/V) POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DO TIPO MALDI-TOF

Todas as bandas proteicas visualizadas no gel de eletroforese SDS-PAGE 10% do *pool* de amostras tratadas com acetona 50% (v/v) foram submetidas a identificação por espectrometria de massas do tipo MALDI TOF.

Na corrida eletroforética do *pool* de proteínas plasmáticas tratadas com acetona 50% (v/v) a banda proteica designada com a letra B foi identificada como sendo mistura da proteína α-2-M e albumina para todos os grupos em estudo (grupo DM1 e DM2 com mau e bom controle glicêmico e grupo controle), a banda proteica

designada pela letra C foi identificada como proteína Ceruloplasmina e a banda proteica designada com a letra P foi identificada como Haptoglobina (TABELA 8).

TABELA 8. IDENTIFICAÇÃO DAS BANDAS PROTEICAS TRATADAS COM ACETONA 50% (v/v) DO GRUPO DM1 COM MAU E BOM CONTROLE GLICÊMICO E GRUPO CONTROLE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DO TIPO MALDI-TOF

BANDA/ POOL	DM1/DM2 HbA1c≥7%	DM1/DM2 HbA1c<7%	CONTROLE
A	-----	-----	-----
B	α-2-Macroglobulina Albumina	α-2-Macroglobulina Albumina	α-2- Macroglobulina Albumina
C	Celuroplasmina	Celuroplasmina	Celuroplasmina
D	-----	-----	-----
E	Albumina	Albumina	Albumina
F	Albumina	Albumina	Albumina
G	Transferrina	Transferrina	Transferrina
H	Albumina	Albumina	Albumina
I	A-1-antitransferrina	A-1-antitransferrina	A-1- antitransferrina
J	Haptoglobina	Haptoglobina	Haptoglobina
K	ApoA-I/ Imunoglobulina de cadeia leve	ApoA- I/Imunoglobulina de cadeia leve	ApoA- I/Imunoglobulina de cadeia leve
L	Haptoglobina	Haptoglobina	Haptoglobina

ApoA-I: Apolipoproteína A-I;

(-----): sem identificação.

Fonte: O autor, 2018

As bandas proteicas que apresentaram diferenças tanto no Kit Proteome Purify™ 2 como para a acetona 50% (v/v) foram identificadas como sendo as mesmas proteínas, apenas foram designadas com letras diferentes em cada gel eletroforético.

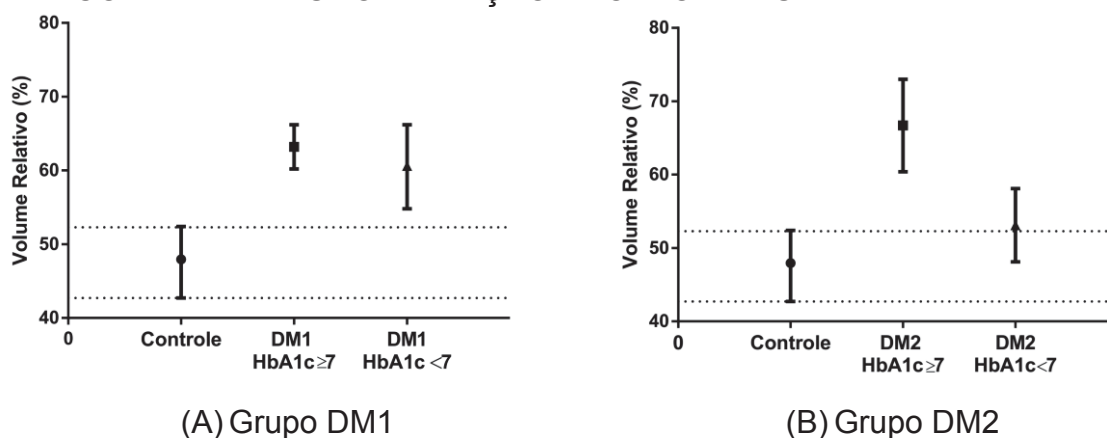
5.5 ANÁLISE DENSITOMÉTRICA COMPARATIVA DAS BANDAS PROTEICAS DOS GRUPOS DM1, DM2 E CONTROLE TRATADOS COM KIT PROTEOME PURIFY™ 2

As análises densitométricas apresentadas a seguir foram realizadas apenas para as bandas que, após análises estatísticas, apresentaram diferenças significativas em seus volumes relativos. O parâmetro densitométrico empregado na análise de quantificação das bandas foi o volume relativo percentual (vol.%) detectado a partir da relação entre o volume da banda analisada e o volume da banda normalizadora. A banda H foi selecionada como banda normalizadora pela boa resolução e alta intensidade e identificada como transferrina nas amostras tratadas com com kit de imunodepleção e albumina nas amostras extraídas com acetona 50% (v/v).

5.5.1 Análise comparativa densitométrica da proteína α -2-macroglobulina dos grupos DM1 e DM2 com hemoglobina glicada $\geq 7\%$, $< 7\%$ e grupo controle tratados com kit Proteome Purify™ 2

O volume relativo (%) da banda C identificada como a proteína α -2-M apresentou diferença significativa nas condições de estudo. As médias dos volumes relativos do grupo DM1 com bom e mau controle glicêmico foram respectivamente maiores, 63,1% e 60,5%, em relação ao grupo controle (47,5%) (FIGURA 7 A).

FIGURA 7. ANÁLISE DENSITOMÉTRICA COMPARATIVA DA PROTEINA ALFA-2-MACROGLOBULINA NOS GRUPO DM1, DM2 E CONTROLE TRATADOS COM KIT DE IMUNODEPLEÇÃO PROTEOME PURIFY 2.



Comparação dos valores densitométricos da alfa-2-macroglobulina nos grupos (A) DM1 e (B) DM2 com mau controle glicêmico (HbA1c $\geq 7\%$), bom controle glicêmico (HbA1c $< 7\%$) e grupo controle/não-diabéticos. Os resultados estão apresentados como média e as barras verticais são os intervalos de confiança de 95%. As linhas horizontais pontilhadas representam o limite de confiança de 95% para o grupo controle/não-diabéticos.

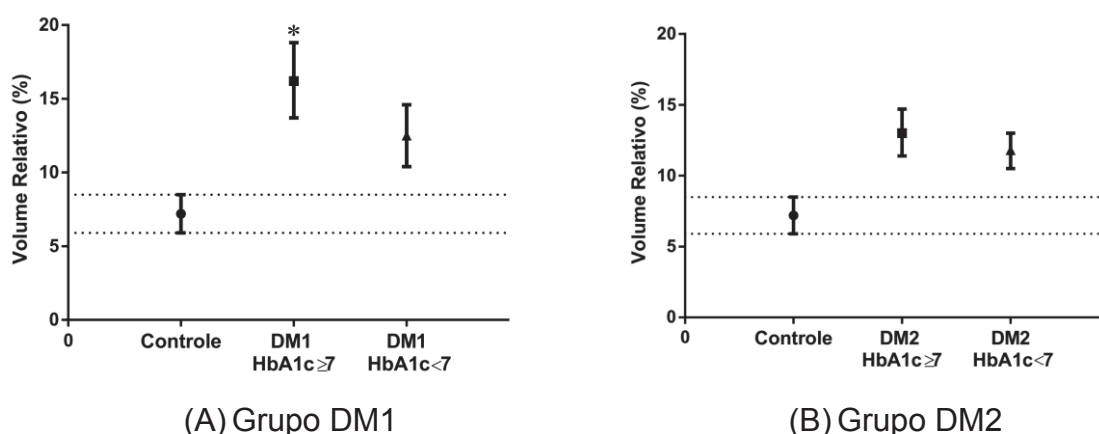
Já no grupo DM2, a média do volumes relativos da proteína α -2-macroglobulina foi estatisticamente maior (66,7%) somente para o subgrupo com mau controle glicêmico em relação ao grupo controle (47,5%), (FIGURA 7 B).

5.5.2 Análise comparativa densitométrica da proteína ceruloplasmina dos grupos DM1 e DM2 com hemoglobina glicada $\geq 7\%$, $< 7\%$ e grupo controle tratados com kit Proteome Purify™ 2

A média do volumes relativo da banda D identificada como a proteína plasmática ceruloplasmina (TABELA 7) no grupo DM1 com mau (16,2%) e bom controle glicêmico (12,5%) foram significativamente maiores em relação ao grupo controle (7,2%) mas o volume relativo da Cp para o grupo DM1 na condição de mau controle glicêmico foi estatisticamente superior em comparação com o grupo DM1 com bom controle glicêmico (FIGURA 8A).

Para o grupo DM2 com mau e bom controle glicêmico, as médias dos volumes relativos da proteína Cp foram 13,0% e 11,8% respectivamente, sendo estatisticamente superiores em relação ao controle grupo controle/não-diabéticos (7,2%), (FIGURA 8B).

FIGURA 8. ANÁLISE DENSITOMÉTRICA COMPARATIVA DA CERULOPLASMINA NOS GRUPO DM1, DM2 E CONTROLE TRATADOS COM KIT DE IMUNODEPLEÇÃO PROTEOME PURIFY 2



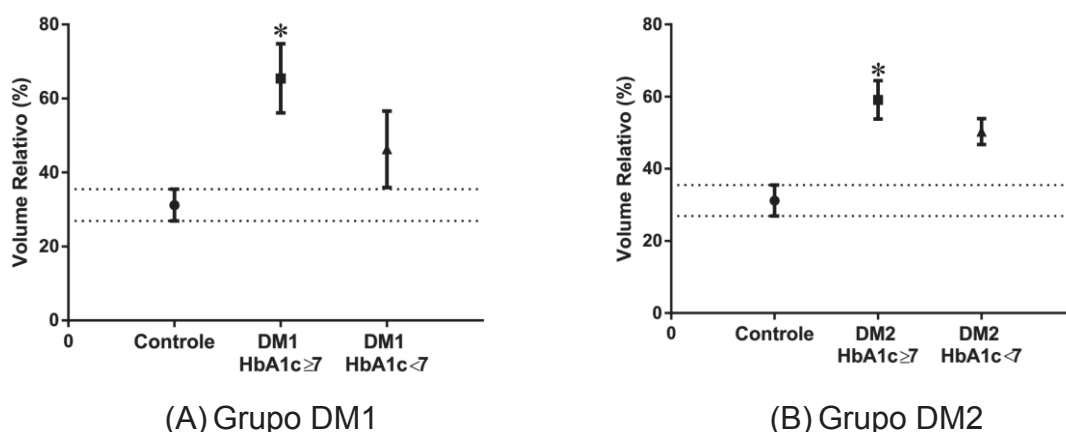
Comparação dos valores densitométricos da ceruloplasmina nos grupos (A) DM1 e (B) DM2 com mau controle glicêmico (HbA1c $\geq 7\%$), bom controle glicêmico (HbA1c $< 7\%$) e grupo controle). O asterisco (*) representa diferença estatística entre os subgrupos DM1. Os resultados estão apresentados como média e as barras verticais são os intervalos de confiança de 95%. As linhas horizontais pontilhadas representam o limite de confiança de 95% para o grupo controle/não-diabéticos.

5.5.3 Análise comparativa densitométrica da proteína Haptoglobina dos grupos DM1 e DM2 com hemoglobina glicada $\geq 7\%$, $< 7\%$ e grupo controle tratados com kit Proteome Purify™ 2

A proteína Haptoglobina, designada como banda N apresentou um volume relativo médio estatisticamente maior nos subgrupos DM1 (65,4% e 46,3%) e DM2 (59,1% e 50,3 %) em relação ao grupo controle (31,2%) (FIGURA 9A).

Além disso, o grupo DM1 como mau controle glicêmico apresentou um volume médio estatisticamente superior 65,4% em comparação ao grupo DM1 com bom controle glicêmico (46,3%). O mesmo foi observado em relação ao grupo DM2 com mau controle glicêmico (59,1%) em relação ao DM2 com bom controle glicêmico (50,3%) (FIGURA 9B).

FIGURA 9. ANÁLISE DENSITOMÉTRICA COMPARATIVA DA HAPTOGLOBINA CORRESPONDENTE A BANDA N NOS GRUPO DM1, DM2 E CONTROLE TRATADOS COM KIT DE IMUNODEPLEÇÃO PROTEOME PURIFY 2



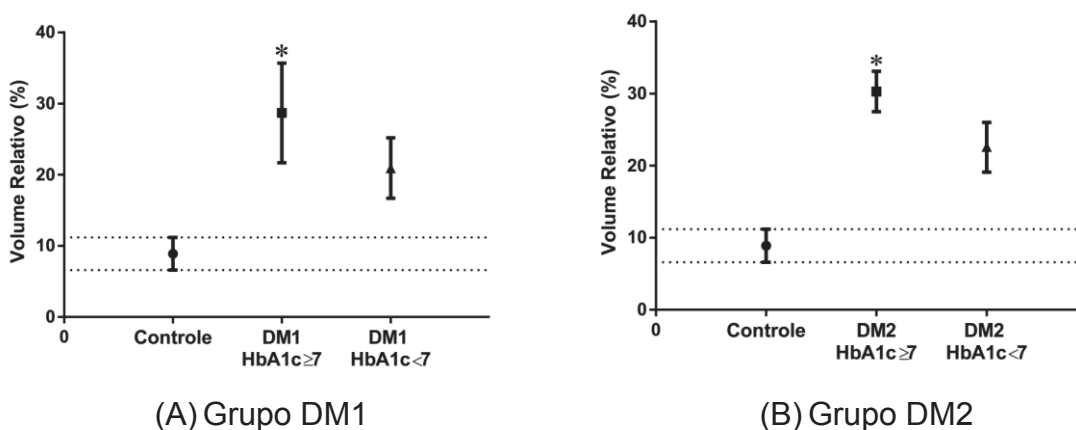
Comparação dos valores densitométricos da haptoglobina nos grupos (A) DM1 e (B) DM2 com mau controle glicêmico (HbA1c $\geq 7\%$), bom controle glicêmico (HbA1c $< 7\%$) e grupo controle/não-diabéticos). O asterisco (*) representa diferença estatística significativa entre os subgrupos DM1 e do DM2. Os resultados representam média e as barras verticais são os intervalos de confiança de 95%. As linhas horizontais pontilhadas representam o limite de confiança de 95% para o grupo controle/não-diabéticos.

A banda proteica designada com a letra P também foi identificada como haptoglobina no grupo DM1 como no grupo DM2 e os resultados densitométricos foram equivalentes ao da banda N. A haptoglobina apresentou um volume relativo médio estatisticamente maior para os grupos DM1 e DM2 em relação ao grupo controle/não-diabéticos (FIGURA 10 A E B).

Os grupos DM1 e DM2 com mau controle glicêmico apresentaram respectivamente volumes relativos médios estatisticamente maiores (28,7% e 30,3%)

quando comparados ao grupo DM1 e DM2 com bom controle (20,9% e 22,6%) e com o grupo controle (8,9%) (FIGURA 10 A e B).

FIGURA 10. ANÁLISE DENSITOMÉTRICA COMPARATIVA DA HAPTOGLOBINA CORRESPONDENTE A BANDA P NOS GRUPO DM1, DM2 E CONTROLE TRATADOS COM KIT DE IMUNODEPLEÇÃO PROTEOME PURIFY 2



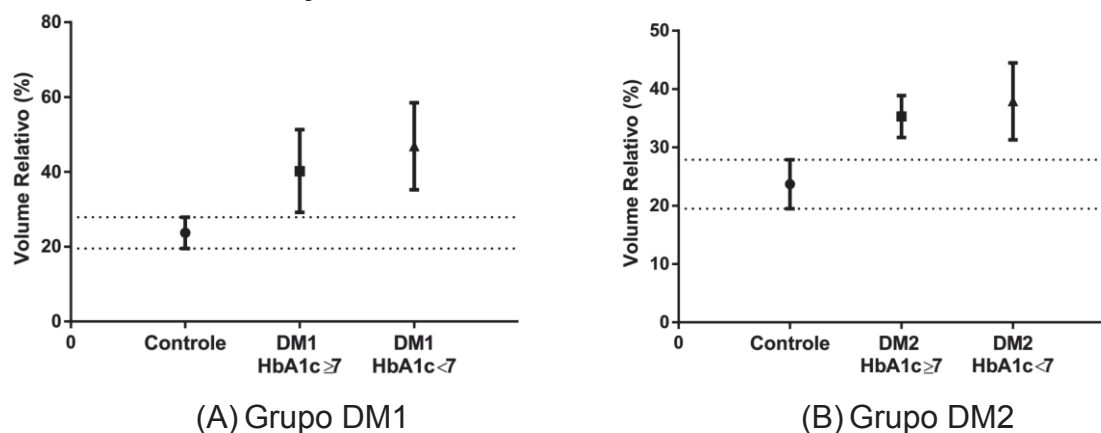
Comparação dos valores densitométricos da haptoglobina nos grupos (A) DM1 e (B) DM2 com mau controle glicêmico (HbA1c ≥ 7%), bom controle glicêmico (HbA1c < 7%) e grupo controle/não-diabéticos. O asterisco (*) representa diferença estatística significativa entre os subgrupos DM1 e do DM2. Os resultados representam a média e as barras verticais são os intervalos de confiança de 95%. As linhas horizontais pontilhadas representam o limite de confiança de 95% para o grupo controle/não-diabéticos.

5.5.4 Análise comparativa densitométrica da proteína apolipoproteína A-I dos grupos DM1 e DM2 com hemoglobina glicada ≥ 7%, < 7% e grupo controle tratados com kit Proteome Purify™ 2

A banda proteica O identificada como a proteína apolipoproteína A-I (TABELA 7) apresentou volume relativo médio estatisticamente maiores nos grupos DM1 com mau (40,2%) e bom (46,9%) controle glicêmico em relação ao controle (23,7%), não havendo diferença estatística significativa entre os grupos DM1 (FIGURA 11 A).

Por outro lado, não houve diferenças entre os volumes relativos médios dos grupos DM2 com mau (35,3%) ou bom (37,9%) controle glicêmico quando comparados com o controle (23,7%) (FIGURA 11 B).

FIGURA 11. ANÁLISE DENSITOMÉTRICA COMPARATIVA DA APOLIPOPROTEÍNA A-I NOS GRUPO DM1, DM2 E CONTROLE TRATADOS COM KIT DE IMUNODEPLEÇÃO PROTEOME PURIFY 2



Comparação dos valores densitométricos da apolipoproteína A-I nos grupos (A) DM1 e (B) DM2 com mau controle glicêmico (HbA1c ≥ 7%), bom controle glicêmico (HbA1c < 7%) e grupo controle/não-diabéticos. Os resultados estão apresentados como média e as barras verticais são os intervalos de confiança de 95%. As linhas horizontais pontilhadas representam o limite de confiança de 95% para o grupo controle/não-diabéticos.

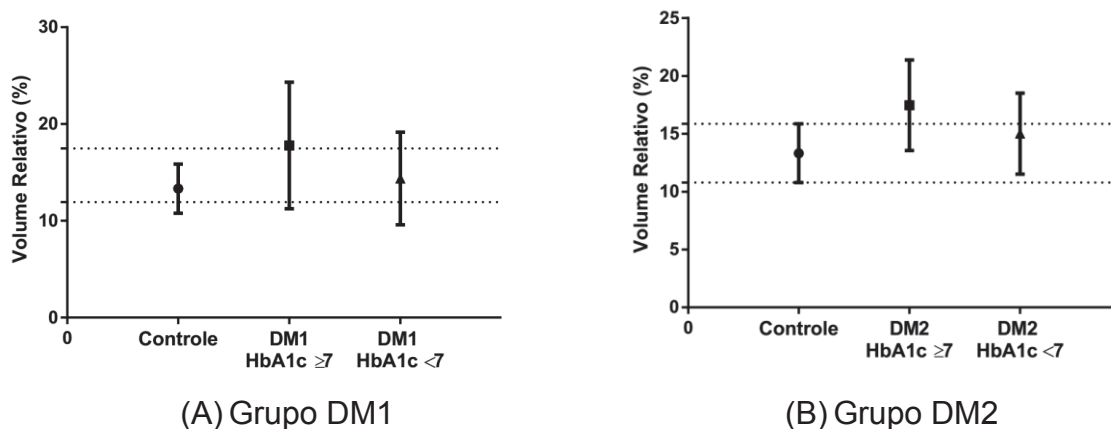
5.6. ANÁLISE DENSITOMÉTRICA COMPARATIVA DAS BANDAS PROTEICAS DOS GRUPOS DM1 E DM2 COM HEMOGLOBINA GLICADA ≥ 7%, < 7% E GRUPO CONTROLE TRATADAS COM ACETONA 50% (V/V)

Através da análise visual, foi possível identificar três bandas proteicas que poderiam apresentar diferença de expressão entre os grupos estudados.

5.6.1 Análise comparativa densitométrica da proteína α-2-macroglobulina dos grupos DM1 e DM2 com hemoglobina glicada ≥ 7%, < 7% e grupo controle com solvente acetona 50% (v/v)

O volume relativo médio da banda proteica B identificada com a proteína alfa-2-macroglobulina nos diferentes grupos DM1 e DM2 não apresentou diferença estatística significativa em relação ao grupo controle ou entre os grupos diabéticos DM1 e DM2 com mau e bom controle glicêmico (FIGURA 12).

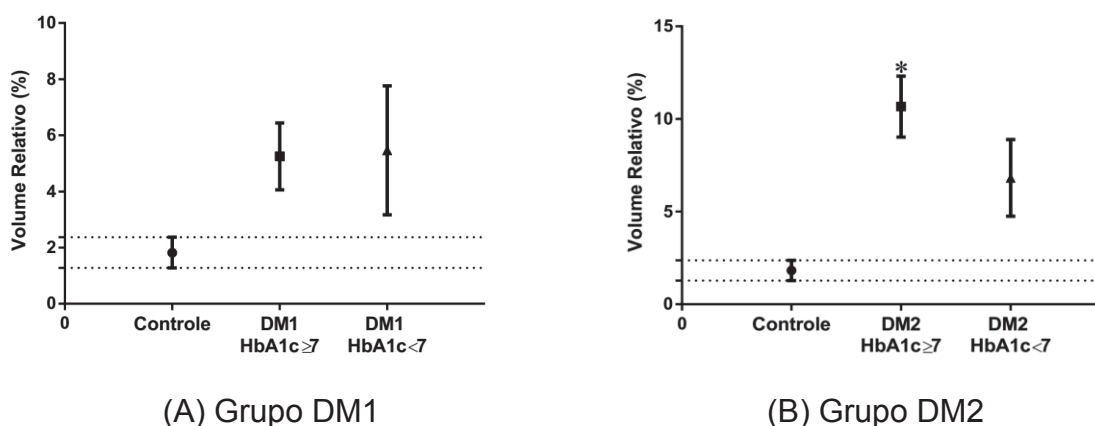
FIGURA 12. ANÁLISE DENSITOMÉTRICA COMPARATIVA DA PROTEÍNA ALFA-2-MACROGLOBULINA NOS GRUPOS DM1, DM2 E CONTROLE TRATADOS ACETONA 50% (V/V)



Comparação dos valores densitométricos da α -2-macroglobulina nos grupos (A) DM1 e (B) DM2 com mau controle glicêmico (HbA1c $\geq 7\%$), bom controle glicêmico (HbA1c $< 7\%$) e grupo controle/não-diabéticos. O asterisco (*) representa diferença estatística significativa entre os grupos diabéticos. Os resultados representam média e as barras verticais são os intervalos de confiança de 95%. As linhas horizontais pontilhadas representam o limite de confiança de 95% para o grupo controle.

5.6.2 Análise comparativa densitométrica da proteína ceruloplasmina dos grupos DM1 e DM2 com hemoglobina glicada $\geq 7\%$, $< 7\%$ e grupo controle com solvente acetona 50% (v/v)

FIGURA 13. ANÁLISE DENSITOMÉTRICA COMPARATIVA DA PROTEÍNA CERULOPLASMINA NOS GRUPO DM1, DM2 E CONTROLE TRATADOS COM ACETONA 50% (V/V)



Comparação dos valores densitométricos da ceruloplasmina nos grupos (A) DM1 e (B) DM2 com mau controle glicêmico (HbA1c $\geq 7\%$), bom controle glicêmico (HbA1c $< 7\%$) e grupo controle. O asterisco (*) representa diferença estatística significativa entre os subgrupos DM2. Os resultados estão apresentados como média e as barras verticais são os intervalos de confiança de 95%. As linhas horizontais pontilhadas representam o limite de confiança de 95% para o grupo controle.

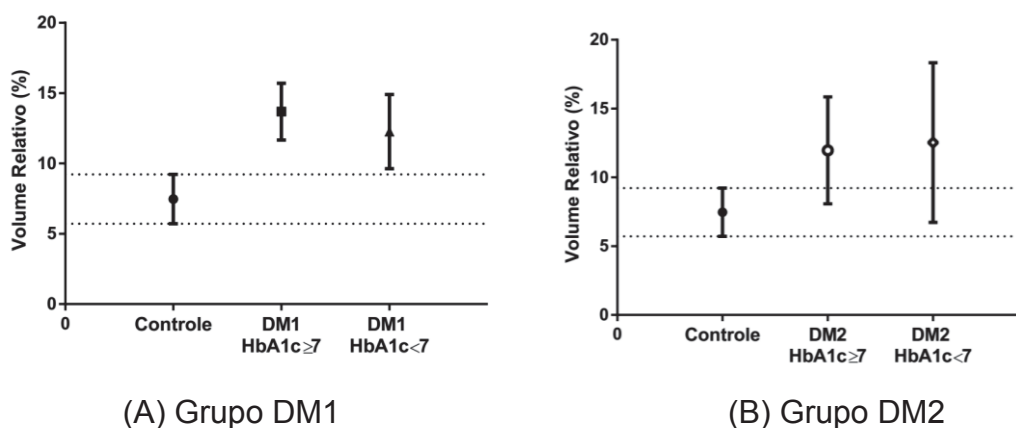
Ao avaliar o volume relativo da proteína plasmática Ceruloplasmina nos diferentes grupos (DM1 e DM2) tratados com acetona (50%v/v), foi possível verificar que o grupo de pacientes diabéticos diferiu consideravelmente, apresentando um

volume relativo maior da Cp quando comparado com o grupo controle (FIGURA 13 A e B). Os volumes relativos médios dos grupos DM1 com mau (5,2%) e bom controle glicêmico (5,4%) foram estatisticamente maiores em relação ao grupo controle (1,8%), não havendo diferença estatística entre os subgrupos DM1 (FIGURA 13 A). Já o volume relativo médio do grupo DM2 com mau controle glicêmico foi estatisticamente maior (10,6%) quando comparado com o grupo DM2 na condição de bom controle glicêmico (6,8%) e o grupo controle (1,8%) (FIGURA 13 B).

5.6.3 Análise densitométrica comparativa da proteína Haptoglobina dos grupos DM1 e DM2 com hemoglobina glicada $\geq 7\%$, $< 7\%$ e grupo controle/não-diabéticos com solvente acetona 50% (v/v)

A banda proteica L foi identificada como Hp em todos os grupos em estudo. Os volumes médios da Hp nos grupos DM1 com mau (13,6%) e bom controle glicêmico (12,2%) foram estatisticamente maiores, em relação ao grupo controle (7,4%) (FIGURA 14 A). Já no grupo DM2, apenas o volume relativo médio do grupo com mau controle glicêmico foi estatisticamente maior (11,9%) em relação ao grupo controle (7,4%). O grupo DM2 com bom controle glicêmico (12,5%) não diferiu estatisticamente em relação ao grupo controle (7,4%) devido a grande variabilidade da amostra na eletroforese (FIGURA 14 B).

FIGURA 14. ANÁLISE DENSITOMÉTRICA COMPARATIVA PROTEÍNA HAPTOGLOBINA NOS GRUPO DM1, DM2 E CONTROLE TRATADOS ACETONA 50% (V/V)



Comparação dos valores densitométricos da haptoglobina nos grupos (A) DM1 e (B) DM2 com mau controle glicêmico (HbA1c $\geq 7\%$), bom controle glicêmico (HbA1c $< 7\%$) e grupo controle/não-diabéticos. Os resultados estão apresentados como média e as barras verticais são os intervalos de confiança de 95%. As linhas horizontais pontilhadas representam o limite de confiança de 95% para o grupo controle/não-diabéticos.

6. DISCUSSÃO

6.1 CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS E BIOQUÍMICAS DOS GRUPOS ESTUDADOS

A hemoglobina glicada (HbA1c ou A1c) é considerada um marcador de controle glicêmico e usada como ferramenta de triagem do diabetes *mellitus* (ADA, 2017). Concentrações de HbA1c superiores a 7 % indicam que pacientes diabéticos apresentam um controle glicêmico inadequado, que favorece o desenvolvimento precoce das complicações inerentes ao DM, enquanto concentrações de HbA1c menor do que 7% indicam um bom controle glicêmico (SDB, 2016). Através dos valores de HbA1c (TABELA 4), foi possível observar que independentemente do tipo de diabetes *mellitus*, existem pacientes com controle glicêmico adequado (HbA1c <7%) e com controle glicêmico inadequado (HbA1c ≥7%).

Os valores de glicemia de jejum do grupo DM1 e DM2 com mau controle glicêmico (304 mg/dL ±57 e 267 mg/dL ± 35) diferem substancialmente em relação ao grupo controle (97 mg/dL ± 3) e aos grupos DM1 e DM2 com bom controle glicêmico respectivamente (108 mg/dL ± 27 e 105 mg/dL ± 10). Os grupos diabéticos com bom controle glicêmico apresentam glicemia de jejum alterada em relação ao valores de referência, mas deve considerar que a glicemia de jejum reflete apenas uma única dosagem momentânea a data da coleta e o teste de HbA1c representa a média ponderada das glicemias médias diárias durante os últimos 2 a 3 meses (NETTO et al., 2009). Segundo Guidoni e colaboradores (2009), valores de glicemia e HbA1c muito elevados indicam pouca adesão do portador ao tratamento adequado, tanto em relação aos hábitos alimentares, estilo de vida e uso da medicação (via oral em subcutânea) (GUIDONI et al., 2009).

Em relação ao perfil lipídico, é conhecido que o DM afeta o metabolismo dos lípidos, que estão diretamente associados a Doença arterial coronariana (SBD, 2016). A concentração de colesterol LDL-C não diferiram entre os grupos, bem como os valores de HDL-C e triglicerídeo também não apresentam diferença significativa. Pacientes diabéticos tanto tipo 1 como tipo 2 são frequentemente portadores de uma série de fatores de risco para doenças aterotrombóticas, pois a lipotoxicidade associada a glicotoxicidade aumentam potencialmente o risco cardiovascular (SBD, 2016). A concentração de colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL-C) é

referida como baixa em pacientes diabéticos e, conseqüentemente, o transporte reverso de colesterol prejudicado, o que favorece a deposição deste lípides na íntima das artérias (aterosclerose). Quando existe uma ausência de insulina, a lipólise se apresenta aumentada, ocorre elevação concomitante dos ácidos graxos livres (AGL) e glicose. Os AGL promovem a formação das lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), que se acumulam devido a redução da atividade de lipase lipoproteica (LPL), que depende da insulina, com o aumento de VLDL e diminuição LPL ocorre um aumento de triglicérides e redução de HDL-colesterol. No entanto, para os grupos diabéticos em estudo, os valores de HDL-C não diferiram em relação aos controles, fato este deve-se ao uso de medicação hipolipemiante (dados não disponíveis).

A creatinina sérica é um parâmetro bioquímico usado como marcador de função glomerular renal (SBN, 2011; SODRÉ; COSTA; LIMA, 2007). Este parâmetro quando avaliado, não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos em estudo, e evidenciou desta forma que os grupos DM1 e DM2 com mau e bom controle glicêmico apresentam concentração de creatinina dentro da faixa de normalidade ou intervalo de referência (0,6-1,3mg/dL), sugerindo desta forma que estes indivíduos não apresentam lesão renal manifesta (SBN, 2011), mesmo tendo sido diagnosticados com DM a cerca de 15 anos.

A concentração de albumina sérica, no contexto da pesquisa, foi utilizado como um marcador de perda proteica pelo sistema renal e conseqüente dano renal (SANTOS et al., 2004). O grupo DM1 com mau controle glicêmico apresentou uma concentração menor de albumina sérica e estatisticamente significativa ($3,7\text{g/dL} \pm 0,49$) em relação ao grupo DM1 e DM2 com bom controle glicêmico ($4,26\text{g/dL} \pm 0,42$; $4,2\text{g/dL} \pm 0,23$), o que não diferiu em relação ao grupo controle ($3,9\text{g/dL} \pm 0,2$). Porém, esta variação na concentração da albumina sérica manteve-se dentro do valor de referência (3,5 a 5,2 g/dL) para indivíduos saudáveis, evidenciando assim que o grupo de pacientes diabéticos não apresentam alteração renal significativa. Segundo Tschiedel (2014) problemas renais como nefropatia tendem a surgir nos pacientes diabéticos a partir dos 10 anos de diagnóstico da doença.

6.2 ANÁLISE COMPARATIVA DE EFICÁCIA ENTRE KIT PROTEOME PURIFY™ 2 E ACETONA 50% (V/V)

O kit Proteome Purify™ 2 mostrou-se um método mais eficiente para ser usado no estudo de proteínas plasmáticas em relação à metodologia com acetona 50% (v/v). O kit Proteome Purify™ 2 é uma metodologia eficaz na depleção das proteínas mais abundantes com base na imunodepleção direcionada à albumina e IgG da amostra. Em um estudo proteômico realizado com pacientes com retinopatia diabética em Tiwan, foi utilizado um kit comercial de imunodepleção para albumina e IgG (LU et al., 2013). Segundo Lu e colaboradores (2013) uma abordagem baseada em proteômica a fim de identificar proteínas plasmáticas diferencialmente expressas em pacientes diabéticos é necessário uma metodologia eficaz para a imunodepleção de proteínas de alta abundância. Já em outro estudo proteômico em modelo animal com objetivo de identificar proteínas no soro associadas à progressão do DM2 também foi utilizado uma metodologia comercial e já padronizada de esgotamento das proteínas mais abundantes (albumina, IgG, α 1-antitripsina, IgM, transferrina, haptoglobina e fibrinogênio) a qual mostrou-se eficiente e necessária para o seguimento da pesquisa (TAKAHASHI et al., 2013). Segundo Raiz e colaboradores (2010) a descoberta de proteínas diferencialmente expressas pode fornecer um método adjunto para a detecção precoce de risco para o DM2, mas requer um conjunto de técnicas e tecnologias analíticas avançadas e muitas vezes de alto custo (RIAZ; ALAM; AKHTAR, 2010; SCHVARTZ et al., 2015).

No presente trabalho, a precipitação com acetona 50% (v/v) mostrou menor eficiência em relação ao kit Proteome Purify™ 2. Na fração precipitada não foi possível identificar visualmente bandas proteicas com diferença de intensidade (dados não mostrados) e na fração sobrenadante foram identificadas 2 proteínas diferencialmente expressas em indivíduos diabéticos em relação a indivíduos não-diabéticos.

O princípio da precipitação de proteínas com acetona consiste na redução da solubilidade das proteínas no meio aquoso. A adição de um solvente orgânico (metanol, propanol, acetonitrila ou acetona) na amostra proteica promove uma redução na constante dielétrica do meio e aumento das interações eletrostáticas intermoleculares. Os solventes orgânicos, como a acetona precipitam facilmente as proteínas hidrofílicas, enquanto que as proteínas com maior número de resíduos de hidrofóbicas tendem a permanecer solúveis no sobrenadante como por exemplo, a albumina (THONGBOONKERD et al., 2002). Segundo Fiest e Hummon (2015) a precipitação com acetona (com diferentes graus de diluição de 50% a 80% v/v) é uma

metodologia muito utilizada ainda por ser simples de realizar e de baixo custo, tornando-a extremamente útil (FEIST; HUMMON, 2015).

6.3 ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA DOS POOLS DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS DOS GRUPOS DM1 E DM2 COM BOM E MAU CONTROLE GLICÊMICO E GRUPO CONTROLE.

A análise proteômica comparativa do tipo *bottom-up* revelou a expressão diferencial das proteínas α -2-macroglobulina, ceruloplasmina, apolipoproteína A-I e haptoglobina nas diferentes condições estabelecidas para o estudo.

α -2-Macroglobulina

A proteína α -2-Macroglobulina (banda proteica C), nos grupos DM1 e DM2 com mau e bom controle glicêmico tratados com kit Proteome Purify™ 2, apresentou uma expressão diferencial estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Ao avaliar o volume relativo da banda proteica designada com a letra B e identificada como a proteína α -2-macroglobulina tratada com acetona (50%v/v) nas condições de estudo, esta não apresentou diferença estatística significativa em relação ao controle ou entre os subgrupos (DM1 e DM2 com mau e bom controle glicêmico), fato este deve-se em decorrência da sobreposição de proteínas (α -2-macroglobulina e albumina) na mesma banda proteica.

A α -2-Macroglobulina é uma glicoproteína plasmática de 720 kDa e pertencente à família α -macroglobulina (PIZZO, 2015). Essa proteína é sintetizada nos hepatócitos e tem como funções principais a inibição da fibrinólise e ação antiproteolítica de amplo espectro, cujo mecanismo é conhecido como a “hipótese da armadilha”. A α -2-Macroglobulina possui uma região de 35 aminoácidos, susceptível à clivagem por proteinases, chamada de “isca”. A interação covalente do tipo tioéster que ocorre entre as proteinases ou proteases e a “isca”, promove uma mudança conformacional na estrutura da α -2-M, que resulta no “aprisionamento” da protease. Uma vez aprisionada, a protease não reage com componentes celulares e substratos proteicos do organismo e o complexo protease- α -2-M é reconhecido por macrófagos e degradado no sistema reticuloendotelial (CHUNG et al., 2016; PIZZO, 2015).

Por se tratar de uma proteína de fase aguda positiva (PFAs) da inflamação, a concentração plasmática da α -2-M apresenta-se elevada em várias doenças e processos inflamatórios crônicos (LORENC et al., 2005; ROTHERMUNDT et al., 2001) incluindo o diabetes *mellitus* (AITKEN et al., 2015; ANNAPOORANI et al., 2006; CHUNG et al., 2016; HO et al., 2010; JAMES et al., 1980). A hiperglicemia estimula a produção de citocinas inflamatórias (IL-6 e TNF- α) (GUHA et al., 2000), através da ativação dos fatores de transcrição pró-inflamatórios pelas espécies reativas de oxigênio geradas no ambiente hiperglicêmico (BODE et al., 2012), o que resulta consequentemente na indução e secreção de reagentes inflamatórios de fase aguda (GUHA et al., 2000; SHAMIM M.; D'SOUZA; MANJREKAR, 2008).

De acordo com James e colaboradores (1980), a concentração plasmática da proteína alfa-2-macroglobulina mostrou-se maior e estatisticamente significativa ($p < 0,001$) em indivíduos diabéticos quando comparado com indivíduos controle pareados por sexo e idade. A concentração plasmática de α -2-M em mulheres diabéticas foi de $672 \pm 167,5$ mg/dL em relação à $463 \pm 80,0$ mg/dL em mulheres não diabéticas, enquanto os homens diabéticos apresentaram uma concentração de alfa-2-M de $496 \pm 156,3$ mg/dL contra $338 \pm 88,9$ mg/dL referente ao grupo de homens sem a doença (JAMES et al., 1980).

O aumento na concentração da α -2-M também é detectada em pacientes com problemas renais. Indivíduos com síndrome nefrótica tem uma maior concentração de α -2-M ($3,13 \pm 0,33$ g/L) em relação aos indivíduos controle ($1,64 \pm 0,15$ g/L; $p = 0,012$) (DE SAIN-VAN DER VELDEN et al., 1998). Possivelmente, o aumento na síntese e de muitas proteínas de baixo peso molecular, com a consequente perda em decorrência das alterações glomerulares e o alto peso molecular da α -2-M, que a impede em ser filtrada via renal, contribuem para as elevadas concentrações dessa proteína em pacientes diabéticos (DE SAIN-VAN DER VELDEN et al., 1998; SURESH et al., 2015). Segundo Suresh e colaboradores (2015), a α -2-M pode ser um novo biomarcador para síndrome nefrótica.

Além do aumento na concentração sérica de α -2-M em indivíduos diabéticos tanto tipo 1 como tipo 2, há um aumento na concentração salivar de α -2-M (AITKEN et al., 2015). O aumento na concentrações de α -2-macroglobulina salivar em pacientes com DM2 foi correlacionada positivamente com a porcentagem de hemoglobina glicada ($r = 0,7748$ e $p < 0,0001$) ou seja, indivíduos com os maiores valores de hemoglobina glicada apresentaram uma elevação na concentração salivar

da proteína α -2-macroglobulina, evidenciando, desta forma que esta proteína pode ser utilizada como biomarcador para diagnóstico e avaliação do controle glicêmico (AITKEN et al., 2015).

Ceruloplasmina (CP)

A proteína ceruloplasmina designada com a letra D quando as amostras de plasma foram tratadas com o kit proteome Purify 2 e designada com a letra C para as amostras tratadas com acetona 50% (v/v) apresentou volume relativo maior e com significância estatística para os grupos DM1 e DM2 com mau e bom controle glicêmico quando comparado com o grupo controle.

A CP é uma metaloenzima de 160 kDa e uma das principais proteínas carreadoras de cobre, ligando-se a aproximadamente a 95% do total de cobre plasmático circulante, além de desempenhar uma função antioxidante no organismo (HARRIS, 2003; KIM et al., 2002; LEE et al., 2015). Considerada, uma proteína de fase aguda positiva, a CP é sintetizada principalmente no fígado, mas monócitos, astrócitos e células de Sertoli também expressam esta proteína, cujo o aumento na concentração plasmática reflete um processo inflamatório crônico de um organismo (KIM et al., 2002; SHUKLA et al., 2006).

De acordo com estudos realizados, indivíduos portadores de DM1 e DM2, apresentam uma elevação significativa nas concentrações plasmáticas da proteína ceruloplasmina (CUNNINGHAM et al., 1995; DAIMON et al., 1998; MEMİŞOĞULLARI; BAKAN, 2004; SKALNAYA; SKALNY; TINKOV, 2017). Estudos realizados por Daimon e colaboradores (1998) reportaram um aumento da concentração de CP em indivíduos diabéticos (1.467 ± 0.085 mg/dL) em relação a indivíduos não-diabéticos (1.418 ± 0.078 mg/dL). Além disso, o mesmo trabalho evidenciou que a concentração plasmática da CP é positivamente correlacionada com a glicemia e a concentração plasmática de cobre ($r = 0,727$, $P < 0,0001$) (DAIMON et al., 1998).

Em outro estudo foi observado que valores de hemoglobina glicada inferiores a 7% refletem na queda da concentração dos reagentes de fase aguda, como por exemplo, da proteína ceruloplasmina (SHAMIM M.; D'SOUZA; MANJREKAR, 2008). Uma das justificativas para o aumento expressivo da concentração da ceruloplasmina em torno de 2 a 3 vezes em indivíduos diabéticos pode ser uma resposta

protetora/antioxidante frente ao aumento do Fe^{2+} livre, o qual pode atuar como catalisador e posterior lipoperoxidação (MEMİŞOĞULLARI E BAKAN 2004). A capacidade antioxidante da ceruloplasmina é devida a sua atividade de ferroxidase, oxidando de Fe^{+2} (ferroso) a Fe^{+3} (férico) na membrana plasmática das células, facilitando a transformação de Apotransferrina (sem ferro ligado) em Transferrina (transportadora de ferro) (LEE et al., 2015).

Entretanto, em condições de estresse oxidativo, como na síndrome metabólica, DM1 e DM2, esta metaloenzima pode atuar como pró-oxidante ao doar íons cobre livre, induzindo a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) como superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) através da reação de Fentons e Haber-Weiss (BARBOSA et al., 2010), bem como oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (SHUKLA et al., 2006). A ação destas espécies reativas de oxigênio sobre proteínas, lípidos e DNA causam lesões celulares e injúria tecidual (BARBOSA et al., 2010).

O aumento na concentração plasmática de ceruloplasmina também foi associado positivamente à progressão da nefropatia diabética. Porém, o mecanismo subjacente a esta associação positiva não foi totalmente elucidado (LEE et al., 2015). O aumento da geração de EROs interrompe a ligação do cobre na ceruloplasmina, induzindo ainda mais a formação de EROs e a oxidação de LDL (SHUKLA et al., 2006). Em condição de homeostasia, o cobre está ligado a ceruplasmina plasmática e a transferência do íon para as células é cuidadosamente regulada. Porém, em uma condição de estresse oxidativo, o cobre não se mantém coordenado na estrutura de suas metaloproteínas, passando a promover peroxidação lipídica (SHUKLA et al., 2006).

Haptoglobina (Hp)

A proteína haptoglobina (Hp) foi detectada em duas bandas, a N e P, sendo que a expressão dessa proteína foi maior para os pacientes DM1 e DM2 com bom e mau controle glicêmico em relação ao grupo controle, ressaltando que a expressão das proteínas nas condições de mau controle glicêmico tanto para DM1 e DM2 foi superior em relação ao DM1 e DM2 com bom controle da glicemia.

A haptoglobina é uma α -2-glicoproteína sérica sintetizada principalmente pelo fígado, mas sua síntese ocorre em menor proporção nos pulmões, pele, baço, rim e

tecido adiposo. A Hp atua como transportadora, antioxidante, imunoreguladora e no processo de angiogênese (MACKELLAR; VIGERUST, 2016). No entanto, essa proteína age principalmente como antioxidante através da ligação à hemoglobina livre formando um complexo não covalente, mas estável (Hb-Hp), que é endocitado por macrófagos e monócitos (KRISTIANSEN et al., 2001; LIPISKI et al., 2013), evitando, desta forma que ocorra um dano oxidativo mediado pelo ferro livre e também a excreção renal deste íon (LANGLOIS; DELANGHE, 1996).

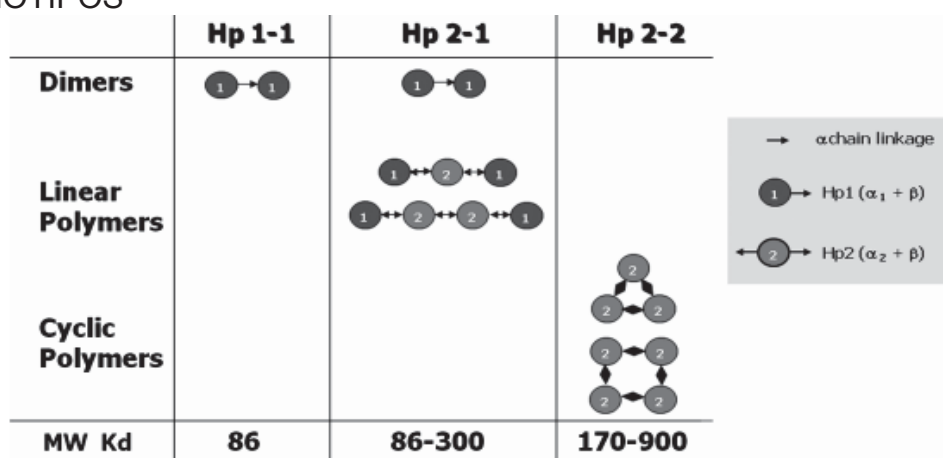
A função antioxidante da Hp é extremamente importante, pois durante o *turnover* do eritrócito, aproximadamente 10% de hemoglobina é liberada na circulação sanguínea, podendo ser filtrada nos glomérulos renais, devido ao seu tamanho (65KDa), e formar precipitados nos túbulos renais (MURRAY, et al, 2014). No entanto, ao se complexar com a Hp, o complexo Hp-Hb, cujo tamanho é aproximadamente 155 KDa, não será filtrado pelo glomérulo renal, e consequentemente não haverá danos ao túbulos renais e perda de ferro pelo organismo, visto que este é essencial para o transporte de oxigênio (MURRAY et al, 2014).

Além disso, cabe ressaltar que atividade antioxidante da Hp humana é dependente da isoforma da proteína (MACKELLAR; VIGERUST, 2016). A Hp é uma proteína plasmática que apresenta heterogeneidade molecular (ALAYASH, 2011) devido a um polimorfismo (rs 72294371) no *locus* Hp, e consiste em 2 alelos codominantes, denominados 1 e 2, formando assim três fenótipos distintos (Hp1-1, Hp2-1 e Hp2-2) e, consequentemente, três proteínas diferentes, que variam de tamanho, forma e função (LANGLOIS; DELANGHE, 1996). As diferentes isoformas da Hp são constituídas por cadeias polipeptídicas com tamanhos diferentes, sendo duas cadeias leves com 8 e 16 KDa e duas cadeias pesadas β , cada uma com 45 KDa e unidas entre si por pontes de dissulfeto (S-S) (KOCH et al., 2002; MACKELLAR; VIGERUST, 2016). A proteína Hp 1-1 é um dímero, a Hp 2-1 é um polímero linear (2-8 monômeros), e Hp 2-2 é um polímero circular de (3-10) monômeros (LEVY et al., 2010) (FIGURA 15).

O complexo Hp-Hb 2-2 é removido da circulação mais lentamente quando comparado com os genótipos Hp 1-1 e Hp 2-1, resultando em uma capacidade funcional menor da proteína (KRUGER et al., 2010). A disfunção do complexo Hp-Hb genótipo 2-2 é ainda acentuada em pacientes DM2 e quanto maior forem os níveis de HbA1c, maior a quantidade de ferro livre e maior o estresse oxidativo, fazendo com que indivíduos com este genótipo sejam mais susceptíveis ao aparecimento das

complicações crônicas (CAHILL et al., 2013; KRUGER et al., 2010). As diferenças funcionais na capacidade antioxidante entre os fenótipos poderiam ser responsáveis por uma associação de susceptibilidade e/ou proteção do DM (MACKELLAR; VIGERUST, 2016).

FIGURA 15. ESTRUTURA DA PROTEÍNA HP EM INDIVÍDUOS COM DIFERENTES GENÓTIPOS



De acordo com a pesquisa de Melamed-Fank e colaboradores (2001), indivíduos com genótipo Hp1-1 apresentam um fator de proteção contra os danos oxidativos, já indivíduos com genótipo Hp2-2 são susceptíveis ao DM2 devido à redução na capacidade antioxidante promovida por Hb livre. Em um estudo realizado na população iraniana, também foi demonstrado que alelo Hp 2-2 é um fator de risco para DM2, enquanto o alelo Hp 2-1 e HP 1-1 poderia ser fator de proteção para o DM2 (AMIRI et al., 2013). Resultados semelhantes também são observados na população estudada em Gana, na África, onde o genótipo Hp2-2 foi considerado um fator de risco para DM2, enquanto os Hp1-1 e Hp 2-1 foram considerados protetores (QUAYE; ABABIO; AMOAH, 2006). Já no DM1, o genótipo Hp 2-2 está relacionado com aumento do risco de doença cardiovascular em comparação com os portadores do genótipo Hp 1-1 (COSTACOU; FERRELL; ORCHARD, 2008). Porém, neste estudo não foi realizado genotipagem da Hp.

Outro ponto importante é uma diminuição do receptor CD163 associado, uma glicoproteína específica de monócitos/macrófagos que se liga e facilita a absorção do complexo Hp-Hb e degradação (LEVY et al., 2007). O DM foi associado a um aumento acentuado do CD163 na forma solúvel, o qual é gerado por clivagem proteolítica de

proteases no domínio extracelular, além da regulação negativa na expressão do CD163 pelas citocinas inflamatórias notavelmente aumentadas no DM (LEVY et al., 2007).

Em um estudo proteômico, Liu e colaboradores (2017) demonstraram que a expressão diferencial das isoformas da proteína Hp (Hp1-1, 2-1 e 2-2) de pacientes DM2 estavam associadas ao nível de HbA1c ou seja, em casos de controle glicêmico inadequado, a expressão das isoformas da haptoglobina é aumentada, evidenciando que a Hp e suas isoformas podem ser potenciais biomarcadores para diagnóstico ou prognóstico do DM2 (LIU et al., 2017).

Além do tipo de isoforma, a função antioxidante da Hp está prejudicada em indivíduos diabéticos devido à fração glicada da hemoglobina livre (GlyHb), fração notavelmente aumentada nestes indivíduos (ASLEH et al., 2003). O complexo haptoglobina hemoglobina glicada (GlyHb-Hp) é formado, porém a atividade oxidativa da GlyHb não é completamente bloqueada pela Hp, e o complexo pode continuar a modificar oxidativamente proteínas. A Hb glicada libera o ferro mais facilmente e o complexo Hp -Hb é removido da circulação mais lentamente (ASLEH et al., 2003; MORENO et al., 2008), consequentemente o ferro livre promove a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) como superóxido de hidrogênio por meio da reação de Haber-Weiss (SWAMINATHAN et al., 2007), além de promover peroxidação lipídica, mediando consequentemente, o desenvolvimento da complicações crônicas como aterosclerose (SHAH; ALAM, 2003). De acordo com estudos realizados em pacientes com DM2, o mau controle glicêmico está associado ao aumento do ferro livre, ao aumento de EROs e as complicações crônicas da doença (SHETTY; PRAKASH; IBRAHIM, 2008).

Em ratos com DM1 induzido por vírus, foi possível detectar um aumento de expressão de Hp precocemente, através de eletroforese bidimensional, bem como aumento na concentração sérica de Hp determinada por ELISA, tornando essa proteína um potencial biomarcador para diagnóstico precoce de DM1 (KRUGER et al., 2010). Além das patologias associadas à inflamação, como o próprio DM, os níveis séricos de Hp se elevam na presença de hormônio do crescimento, uso de medicamentos (glicocorticoides), gravidez, câncer, obesidade, hipóxia, síndrome metabólica (MACKELLAR; VIGERUST, 2016; OH et al., 2011; VOLP et al., 2008).

Apolipoproteína A-I (ApoA-I)

Nos subgrupo DM1 com mau e bom controle glicêmico tratados com Kit de imunodepleção, o volume relativo da banda O, identificada como a proteína apolipoproteína A-I foi maior e apresentou significância estatística em relação ao grupo controle. No entanto não houve diferença de expressão entre os subgrupos DM2 em relação ao controle.

A apolipoproteína A-I ou também denominada como apoA-I é uma proteína de 243 resíduos de aminoácidos, 28 kDa, sintetizada no fígado e intestino, e constituindo o principal componente da lipoproteína de alta densidade (HDL) (FARBSTEIN; LEVY, 2012; ZANNIS; CHRONI; KRIEGER, 2006), da qual representa 70% da massa proteica total (NOVAK; BYDLOWSKI, 1996).

A remoção de colesterol dos macrófagos, o efluxo colesterol dos tecidos extra-hepáticos para o fígado e a inibição da oxidação da LDL, confere a HDL e a ApoA-I um papel antiaterogênico (ANSELL et al., 2003), anti-inflamatório (BARTER et al., 2004), antioxidante (GARNER et al., 1998) e antitrombótico (INEU et al., 2006). No entanto, em condição de estresse oxidativo, como ocorre nos indivíduos diabéticos, a ApoA-1 sofre modificações estruturais pós-traducionais e, conseqüentemente, tem sua função parcialmente ou totalmente alterada, implicando no desenvolvimento de aterosclerose (JALEEL et al., 2010; ORY; SCHAFFER, 2010; TELCI et al., 2000).

O estudo proteômico de Jaleel e colaboradores (2010) revelou modificações pós-traducionais da ApoA-I em amostras de sangue de pacientes com DM1 com mau controle glicêmico. As modificações resultaram na formação de alisina a partir da oxidação direta na cadeia lateral do aminoácido lisina, que é um passo intermediário no dano oxidativo irreversível de carbonilação na forma de ácido aminodípico, promovendo danos e envelhecimento rápido da proteína. Porém, neste estudo não foi avaliado a variabilidade da função da ApoA-I e também não foi constatado diferenças significativas na concentração plasmática desta apolipoproteína nos indivíduos diabéticos adultos em relação a indivíduos não-diabéticos. Mas mudanças pós-traducionais, como a acetilação em resíduos de lisina, podem prejudicar a funcionalidade ApoA-I como receptor de colesterol, afetando o efluxo do mesmo (BRUBAKER et al., 2006).

Em um estudo realizado por Heier e colaboradores (2017), objetivando avaliar a função da HDL em crianças e adultos jovens com diabetes *mellitus* tipo 1, foi constatado através do ensaio *HDL-apoA-I exchange* (HEA), que consiste em avaliar

a função do HDL em liberar a ApoA-I pobre em lipídeos, passo essencial para o transporte de transporte reverso de colesterol, que a função da HDL foi reduzida nos pacientes com DM1 comparados aos controles. Esta diferença foi detectada desde o início da doença e persistiu ao longo dos 5 anos de estudo, corroborando com a hipótese de que a função do HDL é comprometida desde o início e perdura no decorrer da doença como um aspecto crônico do DM (HEIER et al., 2017). O grupo de pacientes diabéticos apresentou aumento da concentração plasmática de ApoA-I, provavelmente devido ao aumento da expressão. No entanto, ainda não é comprovado se realmente o aumento na concentração de apoA-I é um mecanismo compensatório regulado (HEIER et al., 2017).

Em um estudo realizado por Ebtehaj e colaboradores (2017) as propriedades anti-inflamatórias da HDL foram deficitárias em pacientes com DM2, que apresentavam um controle glicêmico adequado. Esse resultado mostra que os pacientes mesmo mantendo a glicemia adequada, apresentam risco aumentado para a doença cardiovascular associada ao DM2. Já a concentração sérica de ApoA-I não apresentou diferença estatística entre o grupo de pacientes diabéticos e os indivíduos não-diabéticos (EBTEHAJ et al., 2017). Por outro lado, em estudo proteômico realizado a partir do plasma de pacientes paquistaneses com DM2, a concentração de ApoA-I mostrou-se diminuída ($1,4 \pm 0,68\text{g/L}$) em relação ao grupo controle ($1,76 \pm 0,67\text{g/L}$). A diminuição da concentração de ApoA-I bem como o aumento da concentração da proteína C reativa (controle: $6,5 \pm 1,30$; diabéticos: $64,2 \pm 28,3 \mu\text{g/mL}$) foram relacionados como fator de risco independente e potenciais biomarcadores proteicos para o DM2 (RIAZ; ALAM; AKHTAR, 2010).

Calderon e colaboradores (2015) constataram o aumento na concentração plasmática da apoA-I, HDL-c e adiponectina em homens e mulheres do estado da Flórida (EUA) com diabetes em relação aos grupo controle, e a concentração da ApoA-I foi maior nas mulheres *versus* homens. Indivíduos portadores de DM1 apresentaram um aumento da concentração de adiponectina, hormônio oriundo dos adipócitos e, indivíduos com DM2 ou obesidade apresentaram uma menor concentração (QIAO et al., 2008). A adiponectina tem ação anti-inflamatória e está associada a lipase lipoproteica (LPL- hidrolisa os triglicerídeos) na população em geral e diabética. As lipases desempenham um papel fundamental na regulação dos níveis de HDL, o que poderia explicar a relação entre adiponectina, HDL-C e ApoA-I (CALDERON et al., 2015).

7. CONCLUSÃO

Neste trabalho, as proteínas plasmáticas dos *pools* de pacientes com diabetes *mellitus* do tipo 1, diabetes *mellitus* do tipo 2, ambos os grupos subdivididos em bom e mau controle glicêmico e de indivíduos não diabéticos (grupo controle) foram separadas por eletroforese unidimensional SDS-PAGE. Os perfis eletroforéticos foram comparados entre os grupos e subgrupos estabelecidos e as bandas proteicas plasmáticas que apresentaram diferenças densitométricas foram identificadas por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF. Diante do exposto, as principais conclusões foram:

- Os pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 1 e tipo 2 com mau ou bom controle glicêmico apresentam um quadro inflamatório subclínico devido ao aumento da expressão das proteínas de fase aguda positiva em relação ao grupo controle;
- A expressão das α -2-macroglobulina, ceruloplasmina e haptoglobina foi maior e estatisticamente significativa nos subgrupos DM1 com mau e bom controle glicêmico e o subgrupo DM2 com mau controle glicêmico em relação ao grupo controle;
- A expressão da ceruloplasmina no subgrupo DM1 com mau controle glicêmico foi maior e estatisticamente significativa em relação ao subgrupo DM1 com bom controle glicêmico;
- Os subgrupos DM1 e DM2 com mau controle glicêmico apresentaram uma expressão maior de haptoglobina em relação aos subgrupos DM1 e DM2 com bom controle glicêmico;
- A expressão da apolipoproteína A-1 foi maior e estatisticamente significativa nos subgrupos DM1 com mau e bom controle glicêmico em relação ao grupo controle.

REFERÊNCIAS

- ADA. Classification and diagnosis of diabetes. **Diabetes Care**, v. 40, n. January, p. 11–24, 2017.
- ADA. American Diabetes Association 2018. **Diabetes Care**, v. 41, n. January, p. 1–172, 2018.
- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 198–207, 2003.
- AGUERO, S. D.; DODOY, E. F.; PINA, E. CARRASCO. Asociación entre nutrientes y hemoglobina glicosilada en diabéticos tipo 2. **Nutrición Hospitalaria**, v. 28, n. 3, p. 1–111, 2016.
- AITKEN, J. P. et al. α -2-Macroglobulin in Saliva Is Associated with Glycemic Control in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. **Disease Markers**, v. 2015, n. 1, p. 5, 2015.
- ALAYASH, A. I. Haptoglobin: Old protein with new functions. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 7–8, p. 493–498, mar. 2011.
- AMIRI, A. A. et al. Haptoglobin polymorphism in individuals with type 2 diabetic microangiopathy. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 5, n. 9, p. 529–535, 2013.
- ANCOCHEA, G.; SÁNCHEZ, M. Resultados de un cribado de retinopatía diabética. Análisis de marcadores de riesgo. **Sociedad Española de Oftalmología**, v. 91, n. 1, p. 15–19, 2016.
- ANDERSON, N. L. et al. The Human Plasma Proteome. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 3, n. 4, p. 311–326, 2004.
- ANDERSON, N. L.; ANDERSON, N. G. The Human Plasma Proteome. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 1, n. 1, p. 845–867, 2002.
- ANNAPOORANI, P. et al. Cardiac isoform of alpha-2 macroglobulin-A new biomarker for myocardial infarcted diabetic patients. **Atherosclerosis**, v. 186, n. 1, p. 173–176, 2006.

ANSELL, B. J. et al. Inflammatory/Antiinflammatory Properties of High-Density Lipoprotein Distinguish Patients from Control Subjects Better Than High-Density Lipoprotein Cholesterol Levels and Are Favorably Affected by Simvastatin Treatment. **Circulation**, v. 108, n. 22, p. 2751–2756, 2003.

ARASTEH, A. et al. Glycated albumin: an overview of the In Vitro models of an In Vivo potential disease marker. **Journal of diabetes and metabolic disorders**, v. 13, n. 1, p. 49, 2014.

ARMBRUSTER, D. A. Fructosamine: structure, analysis, and clinical usefulness. **Clinical Chemistry**, v. 33, n. 12, p. 2153–2163, 1987.

ARMIROTTI, A.; DAMONTE, G. Achievements and perspectives of top-down proteomics. **Proteomics**, v. 10, n. September, p. 3566–3576, 2010.

ARSA, G. et al. Diabetes Mellitus tipo 2 : Aspectos fisiológicos , genéticos e formas de exercício físico para seu controle. **Revista Brasileira de Cineantropom de Desempenho Humano**, v. 11, n. 1, p. 103–111, 2009.

ASLEH, R. et al. Genetically determined heterogeneity in hemoglobin scavenging and susceptibility to diabetic cardiovascular disease. **Circulation Research**, v. 92, n. 11, p. 1193–1200, 2003.

ASSIS, D. M.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A. A Espectrometria de massas aplicada na classificação e identificação de microorganismos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 9, n. 2, p. 344–355, 2011.

BANCO MUNDIAL. Enfrentando o Desafio das Doenças Não Transmissíveis no Brasil. **Banco Mundial**, v. 1, n. 32576, p. 86–107, 2005.

BARBOSA, E. B. et al. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 3, p. 366–375, 2012.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutricao**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

BARTER, P. J. et al. Antiinflammatory properties of HDL. **Circulation Research**, v. 95, n. 8, p. 764–772, 2004.

BELLE, T. VAN; COPPIETERS, K.; VON HERRATH, M. Type 1 Diabetes: Etiology, Immunology, and Therapeutic Strategies. **Physiol Rev**, v. 91, p. 79–118, 2011.

BEM, A. F. DE; KUNDE, J. A importância da determinação da hemoglobina glicada no monitoramento das complicações crônicas do diabetes mellitus. **J Bras Patol Med lab**, v. 42, n. 3, p. 185–191, 2006.

BLUMBERG, R.; POWRIE, F. Microbiota, Disease, and back to Health: A Metastable Journey. **Sci Transl Med**, v. 8, n. 5, p. 444–454, 2012.

BODE, J. G. et al. Hepatic acute phase proteins - Regulation by IL-6- and IL-1-type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF- κ B-dependent signaling. **European Journal of Cell Biology**, v. 91, n. 6–7, p. 496–505, 1 jun. 2012.

BOULANGÉ, C. L. et al. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. **Genome Medicine**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2016.

BOGLIOLO, I., et al. **Bogliolo Patologia**. 8 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2012.

BRUBAKER, G. et al. Apolipoprotein A-I lysine modification: Effects on helical content, lipid binding and cholesterol acceptor activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1761, n. 1, p. 64–72, 2006.

BRUNHAM, L. R. et al. β -cell ABCA1 influences insulin secretion, glucose homeostasis and response to thiazolidinedione treatment. **Nature Medicine**, v. 13, n. 3, p. 340–347, 2007.

BUNN, H. F.; GABBAY, K. H.; GALLOP, P. M. The glycosylation of hemoglobin: relevance to diabetes mellitus. **Science**, v. 200, n. 4337, p. 21–27, 1978.

BURNOUF, T. Modern Plasma Fractionation. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 21, n. 2, p. 101–117, abr. 2007.

CAHILL, L. et al. Haptoglobin genotype is a consistent marker of coronary heart disease risk among individuals with elevated glycosylated hemoglobin. **J Am Coll Cardiol**, v. 27, n. 3, p. 320–331, 2013.

CALDERON, R. M. et al. Elevated lipoprotein lipase activity does not account for the

association between adiponectin and HDL in type 1 diabetes. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 100, n. 7, p. 2581–2588, 2015.

CAMARGO, J. L.; GROSS, J. L. Glyco-hemoglobina (GHbA1c): Aspectos Clínicos e analíticos. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 48, n. 4, p. 451–63, 2004.

CHAN, J. et al. Diabetes in Asia. **Jama**, v. 301, n. 20, p. 2129–2140, 2009.

CHUNG, T.-J. et al. Association of salivary alpha 2-macroglobulin levels and clinical characteristics in type 2 diabetes. **Journal of Diabetes Investigation**, v. 7, n. 2, p. 190–196, 2016.

CLEVELAND, D. W. et al. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. **The Journal of biological chemistry**, v. 252, n. 3, p. 1102–6, 1977.

COHEN, R. M. et al. Discordance between HbA1c and fructosamine: Evidence for a glycosylation gap and its relation to diabetic nephropathy. **Diabetes Care**, v. 26, n. 1, p. 163–167, 2003.

CORRÊA, Z. M.; RALPH, E. Aspectos patológicos da retinopatia diabética. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 68, n. 3, p. 410–414, 2005.

COSTACOU, T.; FERRELL, R. E.; ORCHARD, T. J. A Determinant of Cardiovascular Complication Risk in Type 1 Diabetes. **Analyzer**, v. 57, n. March, p. 1702–1706, 2008.

CUNHA, R. B.; CASTRO, M. D. S.; FONTES, W. Espectrometria de massa de proteínas - O papel chave da espectrometria de massa na era pós-genômica. **Biotecnologia Ciencia e Desenvolvimento am IX**, v. 1, p. 40–46, 2006.

CUNNINGHAM, J. et al. Elevated Plasma Ceruloplasmin in Insulin - Dependent Diabetes Mellitus: Evidence for Increased Oxidative Stress as a Variable Complication. **Metabolism**, v. 44, n. 8, p. 996–999, 1995.

DAIMON, M. et al. Hyperglycemia is a factor for an increase in serum ceruloplasmin in type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 21, n. 9, p. 1525–1528, 1998.

DE SAIN-VAN DER VELDEN, M. G. M. et al. Plasma α -2-macroglobulin is increased in nephrotic patients as a result of increased synthesis alone. **Kidney International**, v. 54, n. 2, p. 530–535, 1998.

DIRKX, R.; SOLIMENA, M. Cholesterol-enriched membrane rafts and insulin secretion. **Journal of Diabetes Investigation**, v. 3, n. 4, p. 339–346, 2012.

DOMINGUETI, C. P. et al. Diabetes mellitus: The linkage between oxidative stress, inflammation, hypercoagulability and vascular complications. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 30, p. 738–745, 2016.

DUNCAN, B. B. et al. Doenças crônicas não transmissíveis no Brasil : prioridade para enfrentamento e investigação. **Rev Saúde Pública**, v. 46, p. 126–134, 2012.

DUNGAN, K. M. 1,5-anhydroglucitol (GlycoMark) as a marker of short-term glycemic control and glycemic excursions. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 8, n. 1, p. 9–19, 2008.

EBTEHAJ, S. et al. The anti-inflammatory function of HDL is impaired in type 2 diabetes: role of hyperglycemia, paraoxonase-1 and low grade inflammation. **Cardiovascular Diabetology**, v. 16, n. 1, p. 1–9, 2017.

EISENBARTH, G. S. Update: Update in type 1 diabetes. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 92, n. 7, p. 2403–2407, 2007.

EMIDIO, N. B. et al. Proteômica: uma introdução aos métodos e aplicações. **HU Revista, Juiz de Fora**, v. 41, n. 3, p. 101–111, 2015.

FARBSTEIN, D.; LEVY, A. P. HDL dysfunction in diabetes: causes and possible treatments. **Expert review of cardiovascular therapy**, v. 10, n. 3, p. 353–61, 2012.

FEIST, P.; HUMMON, A. B. Proteomic challenges: Sample preparation techniques for Microgram-Quantity protein analysis from biological samples. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 2, p. 3537–3563, 2015.

FEITOSA, A. C. R.; ANDRADE, F. S. Avaliação da frutossamina como parâmetro de controle glicêmico na gestante diabética. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 58, n. 7, p. 724–730, 2014.

FERREIRA, C. L. R. A.; FERREIRA, M. G. Características epidemiológicas de pacientes diabéticos da rede pública de saúde: análise a partir do sistema HiperDia. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 1, p. 80–86, 2009.

FIALHO, E.; MORENO, F. S.; ONG, T. P. Nutrição no pós-genoma: Fundamentos e aplicações de ferramentas ômicas. **Revista de Nutricao**, v. 21, n. 6, p. 757–766, 2008.

FIELD, A.; MILES, J.; FIELD, Z. **Discovering Statistics Using SPSS**. First ed. Singapura: British library Cataloguing, 2009. v. 81

FRANCO, L. J. et al. Performance of glycated haemoglobin (HbA1c) as a screening test for diabetes and impaired glucose tolerance (IGT) in a high risk population—The Brazilian Xavante Indians. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 106, n. 2, p. 337–342, 2014.

FREITAS, P. A. C.; EHLERT, L. R.; CAMARGO, J. L. Glycated albumin: a potential biomarker in diabetes. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 61, n. 3, p. 296–304, 2017.

FROM, A. M.; SCOTT, C. G.; CHEN, H. H. The Development of Heart Failure in Patients With Diabetes Mellitus and Pre-Clinical Diastolic Dysfunction: A Population-Based Study. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 55, n. 4, p. 300–305, 2010.

FRYIRS, M. A. et al. Effects of high-density lipoproteins on pancreatic β -cell insulin secretion. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 30, n. 8, p. 1642–1648, 2010.

FURUSYO, N.; HAYASHI, J. Glycated albumin and diabetes mellitus. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 12, p. 5509–5514, 1 dez. 2013.

FUCHS, F.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. **Farmacologia clinica: Fundamentos da terapeutica racional**. 3 ed, Guanabara Koogam, Rio de Janeiro, 2006.

GARNER, B. et al. Oxidation of High Density Lipoproteins: Formation of methionine

sulfonide in apolipoproteins AI and AII is an early event that accompanies lipid peroxidation and can be enhanced by α -tocopherol. **JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, v. 273, n. 11, p. 6088–6095, 1998.

GEHLING, D. J.; CZERNIK, B.; EBRAHEIM, N. A. Orthopedic complications in diabetes. **Bone**, v. 82, p. 79–92, 2016.

GLASS, C. K.; OLEFSKY, J. M. Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance. **Cell Metabolism**, v. 15, n. 5, p. 635–645, 2012.

GOPALAKRISHNAN, V.; PURUSHOTHAMAN, P.; BHASKAR, A. Proteomic analysis of plasma proteins in diabetic retinopathy patients by two dimensional electrophoresis and MALDI-Tof-MS. **Journal of diabetes and its complications**, v. 29, n. 7, p. 928–936, 2015.

GRAVES, P. R.; HAYSTEAD, T. A. J. Molecular Biologist's Guide to Proteomics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 1, p. 39–63, 1 mar. 2002.

GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory Mechanisms in Obesity. **Annual Review of Immunology**, v. 29, n. 1, p. 415–445, 2011.

GROSS, J. L. et al. Diabetes Mellitus: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 46, n. 5, p. 709–717, 2002.

GRUNDY, S. M. et al. Diabetes as Cardiovascular Disease: A Statement for healthcare professionals From the American Heart Association. **Diabetes and Cardiovascular Care**, v. 100, n. 10, p. 1134–1146, 1999.

GUELHO, D.; PAIVA, I.; CARVALHO, M. Diabetes mellitus - um «continuum» fisiopatológico. **Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo**, v. 7, n. 2, p. 28–35, 2014.

GUHA, M. et al. Molecular Mechanisms of Tumor Necrosis Factor α Gene Expression in Monocytic Cells via Hyperglycemia-induced Oxidant Stress-dependent and -independent Pathways. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, v. 275, n. 23, p. 17728–17739, 2000.

GUIDONI, C. M. et al. Assistência ao diabetes no Sistema Único de Saúde: Análise do modelo atual. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 1, p. 37–

48, 2009.

HAO, M. et al. Direct Effect of Cholesterol on Insulin Secretion. A Novel Mechanism for Pancreatic B-Cell Dysfunction. **Diabetes**, v. 56, n. September 2007, p. 2328–2338, 2007.

HARBI, E. et al. Women Transmits Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) More Than Men : Evidences from Parental Inheritance of T2DM Among Bahrainis. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v. 1, p. 7, 2016.

HARRIS, Z. Aceruloplasminemia. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 207, n. 1–2, p. 108–109, 15 mar. 2003.

HAWA, M. I. et al. Adult-onset autoimmune diabetes in Europe is prevalent with a broad clinical phenotype. **Diabetes Care**, v. 36, n. 4, p. 908–913, 2013.

HEIER, M. et al. Reduced HDL function in children and young adults with type 1 diabetes. **Cardiovascular Diabetology**, v. 16, n. 1, p. 85, 2017.

HILDEBRANDT, M. A et al. High Fat Diet Determines the Composition of the Murine Gut Microbiome Independently of Obesity. **Gastroenterology**, v. 137, n. 5, p. 1–18, 2009.

HO, A.-S. et al. Novel biomarkers predict liver fibrosis in hepatitis C patients: alpha 2 macroglobulin, vitamin D binding protein and apolipoprotein AI. **Journal of biomedical science**, v. 17, n. 58, p. 7, 2010.

HUPFELD, C. J.; OLEFSKY, J. M. Type 2 Diabetes Mellitus. In: **Endocrinology: Adult and Pediatric**. Seventh Ed ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2016. p. 691–714.e6.

IBGE. Pesquisa Nacional de Saúde 2013: Percepção do estado de saúde, estilo de vida e doenças crônicas. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)**, p. 181, 2014.

IDF. DIABETES ATLAS. **FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DO DIABETES**, v. 6, n. 1, p. 1–144, 2015.

IMAMURA, F. et al. Risk Factors for Type 2 Diabetes Mellitus Preceded by β -Cell Dysfunction , Insulin Resistance , or Both in Older Adults. **American Jornal of**

Epidemiology, v. 177, n. 12, p. 1418–1429, 2013.

INEU, M. L. et al. Manejo da HDL: avanços recentes e perspectivas além da redução de LDL. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 87, n. 6, p. 788–794, 2006.

ISMAIL, K. Unraveling the Pathogenesis of the Depression-Diabetes Link. In: KATON, W.; MAJ, M.; SARTORIUS, N. (Eds.). . **Depression and Diabetes**. Departamen ed. London: John Wiley e Sons, 2010. p. 29–61.

JALEEL, A. et al. Identification of De Novo Synthesized and Relatively Older Proteins. **Diabetes**, v. 59, n. 1, p. 2366–2374, 2010.

JAMES, K. et al. Serum a2-macroglobulin levels in diabetes. **Jornal Clin Pathol**, v. 33, p. 163–166, 1980.

JIANG, L.; HE, L.; FOUNTOULAKIS, M. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. **JORNAL OF CHOMATOGRAPHY A**, v. 1023, n. 1, p. 317–320, 2004.

JOHNSON, A. M. F.; OLEFSKY, J. M. The origins and drivers of insulin resistance. **Cell**, v. 152, n. 4, p. 673–684, 2013.

KAI, Y. S. et al. “Omics” in pharmaceutical research: overview, applications, challenges, and future perspectives. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 13, n. 1, p. 3–21, 2015.

KIM, C. H. et al. Elevated serum ceruloplasmin levels in subjects with metabolic syndrome: A population-based study. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 51, n. 7, p. 838–842, 2002.

KOCH, W. et al. Genotyping of the common haptoglobin Hp 1/2 polymorphism based on PCR. **Clinical Chemistry**, v. 48, n. 9, p. 1377–1382, 2002.

KRISTIANSEN, M. et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. **Nature**, v. 409, n. 6817, p. 198–201, 2001.

KRUGER, A. J. et al. Haptoglobin as an early serum biomarker of virus-induced autoimmune type 1 diabetes in biobreeding diabetes resistant and LEW1.WR1 rats. **Exp Biol Med**, v. 235, n. 11, p. 1328–1337, 2010.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LANGLOIS, M. R.; DELANGHE, J. R. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. **Clinical Chemistry**, v. 42, n. 10, p. 1589–1600, 1996.

LAPOLLA, A.; DALFRÀ, M. G.; FEDELE, D. Pregnancy complicated by type 2 diabetes: An emerging problem. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 80, n. 1, p. 2–7, 2008.

LEE, M. J. et al. Serum Ceruloplasmin Level as a Predictor for the Progression of Diabetic Nephropathy in Korean Men with Type 2 Diabetes Mellitus. **Diabetes & metabolism journal**, v. 39, n. 3, p. 230–239, 2015.

LEVY, A. et al. Haptoglobin: basic and clinical aspects. **Antioxidants & redox signalling**, v. 12, n. 2, p. 293–304, 2010.

LEVY, A. P. et al. Downregulation of the hemoglobin scavenger receptor in individuals with diabetes and the Hp 2-2 genotype: Implications for the response to intraplaque hemorrhage and plaque vulnerability. **Circulation Research**, v. 101, n. 1, p. 106–110, 2007.

LEY, R. et al. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. **Nature**, v. 444, n. 7122, p. 1022–3, 2006.

LI, M. et al. Genome-wide association study of 1,5-anhydroglucitol identifies novel genetic loci linked to glucose metabolism. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 2812, 2017.

LIM, A. K. H. Diabetic nephropathy - Complications and treatment. **International Journal of Nephrology and Renovascular Disease**, v. 7, n. 1, p. 361–381, 2014.

LIPISKI, M. et al. Human Hp1-1 and Hp2-2 phenotype-specific haptoglobin therapeutics are both effective in vitro and in guinea pigs to attenuate hemoglobin toxicity. **Antioxidants & redox signaling**, v. 19, n. 14, p. 1619–1633, 2013.

LIU, J. et al. Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. **Nat Med.**, v. 15, n. 8, p. 940–945,

2009.

LIU, Z. et al. Differentially expressed haptoglobin as a potential biomarker for type 2 diabetic mellitus in Hispanic population. **BioFactors**, v. 43, n. 3, p. 424–433, 2017.

LONG, X.-J. et al. Diabetes mellitus and prostate cancer risk in Asian countries: a meta-analysis. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 8, p. 4097–4100, 2012.

LOPEZ, J. M. S. et al. Characterization of type 2 diabetes mellitus burden by age and ethnic groups based on a nationwide survey. **Clinical Therapeutics**, v. 36, n. 4, p. 494–506, 2014.

LORENC, L B. DE et al. Structural evaluation of plasma α 2-macroglobulin in acute pancreatitis. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 43, n. 11, p. 1183–1189, 2005.

LU, C.-C. et al. 1, 5-anhydroglucitol levels in type 2 diabetic and non-diabetic subjects in Southern Taiwan. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, n. 6, p. 711–715, 2003.

LU, C. H. et al. Proteomic analysis of retinopathy-related plasma biomarkers in diabetic patients. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 529, n. 2, p. 146–156, 2013.

LUMENG, C. N.; BODZIN, J. L.; SALTIEL, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 1, p. 175–184, 2007.

MACKELLAR, M.; VIGERUST, D. J. Role of Haptoglobin in Health and Disease: A Focus on Diabetes. **Clinical Diabetes Jornal**, v. 34, n. 3, p. 148–157, 2016.

MARASCHIN, J. DE F. et al. Classificação do diabetes mellitos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 95, n. 2, p. 40–46, 2010.

MEMIŞOĞULLARI, R.; BAKAN, E. **Levels of ceruloplasmin, transferrin, and lipid peroxidation in the serum of patients with Type 2 diabetes mellitus**. Journal of Diabetes and its Complications. **Anais...Elsevier**, 1 jul. 2004Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1056872703000321>>. Acesso em:

25 set. 2017

MITANCHEZ, D. et al. The offspring of the diabetic mother - Short- and long-term implications. **Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 29, n. 2, p. 256–269, 2015.

MITANCHEZ, D.; BURGUET, A.; SIMEONI, U. Infants born to mothers with gestational diabetes mellitus: Mild neonatal effects, a long-term threat to global health. **Journal of Pediatrics**, v. 164, n. 3, p. 445–450, 2014.

MORAES, A. C. F. DE et al. Microbiota intestinal e risco cardiometabólico: mecanismos e modulação dietética. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 58, n. 4, p. 317–327, 2014.

MORENO, P. R. et al. Haptoglobin Genotype Is a Major Determinant of the Amount of Iron in the Human Atherosclerotic Plaque. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 52, n. 13, p. 1049–1051, 23 set. 2008.

MURRAY, R.K., B, D.A., BOTHAN, K.M et al. **Bioquímica Ilustrada de Harper**, 29^a ed., Artmed, 2014.

NETTO, A. P. et al. Atualização sobre hemoglobina glicada (HbA1C) para avaliação do controle glicêmico e para o diagnóstico do diabetes: aspectos clínicos e laboratoriais. **J Bras Patol Med Lab**, v. 45, n. 1, p. 31–48, 2009.

NISHIMURA, S. et al. CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. **Nature Medicine**, v. 15, n. 8, p. 914–920, 2009.

NOCTOR, E.; DUNNE, F. Type 2 diabetes after gestational diabetes: The influence of changing diagnostic criteria. **World Journal of Diabetes**, v. 6, n. 2, p. 234, 2015.

NOVAK, E. M.; BYDLOWSKI, S. P. Biologia molecular das dislipidemias. Variação genética das apolipoproteínas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 67, n. 6, p. 411–417, 1996.

O'BRIEN, C. L. et al. The Mental Health in Diabetes Service (MINDS) to enhance psychosocial health: study protocol for a randomized controlled trial. **Trials**, v. 17, n. 1, p. 444, 2016.

OGURTSOVA, K. et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 128, p. 40–50, 2017.

OH, M. K. et al. Hypoxia-inducible factor-1 α enhances haptoglobin gene expression by improving binding of STAT3 to the promoter. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 11, p. 8857–8865, 2011.

ONKAMO, P. et al. Worldwide increase in incidence of Type I diabetes - The analysis of the data on published incidence trends. **Diabetologia**, v. 42, n. 12, p. 1395–1403, 1999.

ORY, D. S.; SCHAFFER, J. E. ApoA-1 in diabetes: Damaged goods. **Diabetes**, v. 59, n. 10, p. 2358–2359, 2010.

PAPATHEODOROU, K. et al. Complications of Diabetes. **Jornal of Diabetes Research**, v. 2, p. 72–111, 2015.

PAPPACHAN, J. M. et al. Diabetic cardiomyopathy: Pathophysiology, diagnostic evaluation and management. **World J Diabetes**, v. 4, n. 45, p. 177–189, 2013.

PETERMANN, X. B. et al. praticado na Atenção Primária à Saúde : uma revisão narrativa. **Saúde Santa Maria**, v. 41, p. 49–56, 2015.

PIMENTA, A. MONTEIRO DE CASTRO. Os desafios do proteoma. **Ciencia Hoje**, v. 32, n. 192, p. 16, 2003.

PIZZO, S. V. When is a Proteinase Inhibitor a Hormone ? The Strange Tale of α 2 - Macroglobulin. **Journal of Nature and Science**, v. 1, n. 7, p. 1–5, 2015.

POLONSKY, K. S. The Past 200 Years in Diabetes. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 14, p. 1332–1340, 2012.

QIAO, L. et al. Adiponectin Reduces Plasma Triglyceride by Increasing. **AMERICAM DIABETES ASSOCIATION**, v. 57, n. July, p. 1824–1833, 2008.

QUAYE, I. K.; ABABIO, G.; AMOAH, A. G. Haptoglobin 2-2 phenotype is a risk factor for type 2 diabetes in Ghana. **Journal of atherosclerosis and thrombosis**, v. 13, n. 2, p. 90–94, 2006.

RADIN, J. Human Genome Diversity Project: History. **International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences**, v. 11, p. 306–310, 2015.

RATH, A. et al. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 6, p. 1760–5, 2009.

REIS, Z. et al. Rastreamento de cardiopatias congênitas associadas ao diabetes mellitus por meio da concentração plasmática materna de frutossamina. **Rev Bras Ginecol Obstet.**, v. 32, n. 2, p. 66–71, 2010.

RIAZ, S.; ALAM, S. S.; AKHTAR, M. W. Proteomic identification of human serum biomarkers in diabetes mellitus type 2. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, n. 5, p. 1103–1107, 2010.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro. Elsevier, 2011.

ROCHA, N. G. et al. História Familiar de Diabetes Mellitus Tipo 2 e Modulação Autonômica Cardíaca. **Rev Socer J**, v. 20, n. 5, p. 321–328, 2007.

RONALD KOLNING et al. Correlation of glucose regulation and hemoglobin A1c in diabetes mellitus. **The New England Journal of Medicine**, v. 295, n. 8, p. 417–419, 1976.

ROTHERMUNDT, M. et al. Inflammatory markers in major depression and melancholia. **Journal of Affective Disorders**, v. 63, n. 1–3, p. 93–102, 2001.

SAMUEL, V. T.; SHULMAN, G. Integrating Mechanisms for Insulin Resistance: Common Threads and missing Links. **Cell**, v. 148, n. 5, p. 852–871, 2013.

SANTOS, N. S. J. et al. Albumina sérica como marcador nutricional de pacientes em hemodiálise. **Revista de Nutricao**, v. 17, n. 3, p. 339–349, 2004.

SAYYID, R. K.; FLESHNER, N. E. Diabetes Mellitus Type 2: A Driving Force for Urological Complications. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 27, n. 5, p. 249–261, 2016.

SILVA, P. **Farmacologia**. 7 ed, Guanabara Koogam, Rio de Janeiro, 2006.

SBD. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2014-2015. **Ac Farmacêutica**

LTDA, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2015.

SBD. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2015-2016. **Ac Farmacêutica Ltda.**, v. 53, n. 10, p. 348, 2016.

SBD; SBPC-ML; FENED. Posicionamento Oficial SBD, SBPC-ML, SBEM e FENAD 2017/2018: Atualização sobre Hemoglobina Glicada (A1C) para avaliação do controle glicêmico e para diagnóstico do Diabetes: Aspectos clínicos e laboratoriais. p. 1–36, 2017.

SBN. Sociedade Brasileira de Nefrologia - Biomarcadores na Nefrologia. In: ABENSUR, H. (Ed.). . **E-Book Biomarcadores na Nefrologia**. SBN ed. São Paulo: SBN, 2011. p. 1–114.

SCHVARTZ, D. et al. The Human Diabetes Proteome Project (HDPP): The 2014 update. **Translational Proteomics**, v. 8–9, p. 1–7, 2015.

SESTERHEIM, P.; SAITOVITCH, D.; STAUB, H. L. Diabetes mellitus tipo 1 : multifatores que conferem suscetibilidade à patogenia auto-imune. **Scientia medica**, v. 17, p. 212–217, 2007.

SHAH, S. V; ALAM, M. G. Role of iron in atherosclerosis. **American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation**, v. 41, n. 3 Suppl 1, p. S80–S83, 1 mar. 2003.

SHAMIM M., S.; D'SOUZA, V.; MANJREKAR, P. Acute phase proteins in newly diagnosed diabetics. **Biomedical Research**, v. 19, n. 1, p. 49–53, 2008.

SHAO, S.; GUO, T.; AEBERSOLD, R. Mass spectrometry-based proteomic quest for diabetes biomarkers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1854, n. 6, p. 519–527, 2015.

SHEARMAN, C. P.; RAWSHDEH, M. Foot complications in patients with diabetes. **Surgery**, v. 28, n. 6, p. 288–292, 2016.

SHETTY, J. K.; PRAKASH, M.; IBRAHIM, M. S. Relationship between free iron and glycated hemoglobin in uncontrolled type 2 diabetes patients associated with complications. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 23, n. 1, p. 67–70, 2008.

SHI, H. et al. TLR4 links innate immunity and fatty acid – induced insulin resistance. **The journal of clinical investigation**, v. 116, n. 11, p. 3015–3025, 2006.

SHRESTHA, G. S.; KAITI, R. Visual functions and disability in diabetic retinopathy patients. **Journal of Optometry**, v. 7, n. 1, p. 37–43, 2014.

SHRUTHI, B. S.; VINODHKUMAR, P.; SELVAMANI. Proteomics: A new perspective for cancer. **Advanced biomedical research**, v. 5, p. 67, 2016.

SHUKLA, N. et al. Does oxidative stress change ceruloplasmin from a protective to a vasculopathic factor? **Atherosclerosis**, v. 187, n. 2, p. 238–250, ago. 2006.

SKALNAYA, M. G.; SKALNY, A. V; TINKOV, A. A. Serum copper, zinc, and iron levels, and markers of carbohydrate metabolism in postmenopausal women with prediabetes and type 2 diabetes mellitus. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 43, p. 1–6, 1 set. 2017.

SLEDDER, M. A. et al. Proteomic analysis in type 2 diabetes patients before and after a very low calorie diet reveals potential disease state and intervention specific biomarkers. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. 1–21, 2014.

SLOBODA, C.; BREZER, V.; MALLONE, R. Insulin and type 1 diabetes: immune connections. **European journal of endocrinology**, v. 168, n. 2, p. 19–31, 2013.

SODRÉ, F. L.; COSTA, J. C. B.; LIMA, J. C. C. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 5, p. 329–337, 2007.

STANKOV, K.; BENC, D.; DRASKOVIC, D. Genetic and epigenetic factors in etiology of diabetes mellitus type 1. **Pediatrics**, v. 132, n. 6, p. 1112–22, 2013.

STECK, A. K.; REWERS, M. J. Genetics of type 1 diabetes. **Clinical chemistry**, v. 57, n. 2, p. 176–185, 2011.

SUMITA, G N. M.; ANDRIOLO, A. A importância da determinação da hemoglobina glicada no monitoramento das complicações crônicas do diabetes mellitus. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 3, p. 169–174, 2008.

SUNDSTEN, T. E. A. **Protein Profiling and Type 2 Diabetes**.

SUNDSTEN, T.; ORTSATER, H. Proteomics in diabetes research. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 297, n. 1–2, p. 93–103, 2009.

SURESH, C. P. et al. Differentially expressed urinary biomarkers in children with idiopathic nephrotic syndrome. **Clinical and Experimental Nephrology**, v. 20, n. 2, p. 273–283, 2015.

SWAMINATHAN, S. et al. The role of iron in diabetes and its complications. **Diabetes Care**, v. 30, n. 7, p. 1926–1933, 2007.

TAKAHASHI, E. et al. Differential proteome analysis of serum proteins associated with the development of type 2 diabetes mellitus in the KK-A y mouse model using the iTRAQ technique. **Journal of Proteomics**, v. 84, n. 2, p. 40–51, 2013.

TALUKDAR, S. et al. Neutrophils mediate insulin resistance in high fat diet fed mice via secreted elastase. **Nat Med**, v. 18, n. 9, p. 1407–1412, 2012.

TELCI, A. et al. Oxidative protein damage in early stage Type 1 diabetic patients. **Diabetes research and clinical practice**, v. 50, n. 3, p. 213–23, 2000.

TESTA, R. et al. N-Glycomic Changes in Serum Proteins in Type 2 Diabetes Mellitus Correlate with Complications and with Metabolic Syndrome Parameters. **Jornal Plos One**, v. 1, p. 1–16, 2015.

THE INT EXP COMMITTEE. **The role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes** **Diabetes Care**, 2009.

THONGBOONKERD, V. et al. Proteomic analysis of normal human urinary proteins isolated by acetone precipitation or ultracentrifugation. **Kidney International**, v. 62, n. 4, p. 1461–1469, 2002.

TSCHIEDEL, B. Complicações crônicas do diabetes. **J. bras. med**, v. 102, n. 5, p. 7–12, 2014.

TURNBAUGH, P. et al. Marked alterations in the distal gut microbiome linked to diet-induced obesity. **Cell host Microbe**, v. 3, n. 4, p. 213–223, 2008.

VALLEDOR, L.; JORRÍN, J. Back to the basics: Maximizing the information obtained by quantitative two dimensional gel electrophoresis analyses by an appropriate

experimental design and statistical analyses. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 1, p. 1–18, 2011.

VALLIS, M. A new dawn for diabetes in Canada. **Canadian Journal of Diabetes**, v. 36, n. 4, p. 210–213, 2012.

VASQUES, A. C. J. et al. Influência do excesso de peso corporal e da adiposidade central na glicemia e no perfil lipídico de pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 2. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 51, n. 9, p. 1516–1521, 2007.

VOLP, A. C. P. et al. Capacidade dos Biomarcadores Inflamatórios em Predizer a Síndrome Metabólica. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 52, n. 3, p. 537–549, 2008.

WALLBERG, M.; COOKE, A. Immune mechanisms in type 1 diabetes. **Trends in Immunology**, v. 34, n. 12, p. 583–591, 2013.

WAN, E. Y. F. et al. Incidence and Predictors for Cardiovascular Disease in Chinese Patients With Type 2 Diabetes Mellitus – A Population-Based Retrospective Cohort Study. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 30, p. 444–450, 2015.

WANG, C. et al. Association between parental history of diabetes and the incidence of type 2 diabetes mellitus differs according to the sex of the parent and offspring's body weight: A finding from a Japanese worksite-based cohort study. **Preventive Medicine**, v. 81, p. 49–53, 2015.

WEISBERG, S. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796–1808, 2003.

WILCOX, G. Insulin and insulin resistance. **The Clinical biochemist Reviews**, v. 26, n. 2, p. 19–39, 2005.

WINER, D. A. et al. B Lymphocytes Promote Insulin Resistance through Modulation of T Lymphocytes and Production of Pathogenic IgG Antibody. **Nat Med**, v. 17, n. 5, p. 610–617, 2011.

WINER, S. et al. Normalization of Obesity-Associated Insulin Resistance through Immunotherapy: CD4+ T Cells Control Glucose Homeostasis. **Nature medicine**, v. 15, n. 8, p. 921–929, 2009.

ZACCARDI, F. et al. Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: a 90-year perspective. **Postgraduate Medical Journal**, v. 92, n. 1084, p. 63–69, 2016.

ZANNIS, V. I.; CHRONI, A.; KRIEGER, M. Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. **Journal of Molecular Medicine**, v. 84, n. 4, p. 276–294, 2006.

APÊNICE 1

TABELA 1. PROTEÍNAS PLASMÁTICAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF.

PROTEÍNA IDENTIFICADA	ESCORE ^a	CS (%) ^b	NMP ^c	ERRO (ppm) ^d
Alfa-2-Mg	160	55%	24/14	100
Ceruloplasmina	129	16%	20/12	200
Haptoglobina	138	27%	28/10	100
ApoA-I	104	32%	27/9	100
Fibrinogênio cadeia beta	121	40%	24/18	200
Alfa-1-Antitripsina	143	48%	43/21	200
Fibrinogênio cadeia Gama	128	35%	31/15	100
Albumina	75	19%	42/12	200
Alfa-2-Mg/ Albumina	158 84	21% 26%	36/21 36/11	200 200
Transferrina	76	19%	32/14	200
Complemento C3	73	18%	40/18	200
Hemopexina	67	17%	19/9	200
Transferrina	145	41%	59/27	100
Haptoglobina/ Imunglobulina de cadeia leve	113 65	30% 52%	34/13 47/13	200 200

^aO valor do score é resultante do pareamento das massas tripticas obtidas no processo de digestão com a enzima tripsina com massas de digestão teórica (*in silico*) das sequências proteicas depositadas na base de dados NCBI nr pelo software MASCOT.

^bCobertura de sequências

^cNúmero de peptídeos buscados e pareados pelo *software* Mascot

^dValor máximo de erro estipulado para o pareamento dos peptídeos

FONTE: O autor, 2018.